

Évaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues, échinoderme, bivalves et poisson

Anis Amara

▶ **To cite this version:**

Anis Amara. Évaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues, échinoderme, bivalves et poisson. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest; Université de Tunis El Manar, 2012. Français. NNT : 2012BRES0013 . tel-00795396

HAL Id: tel-00795396
https://theses.hal.science/tel-00795396

Submitted on 28 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Evaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues, échinoderme, bivalves et poisson

THÈSE DE DOCTORAT en cotutelle entre
L'UNIVERSITÉ DE TUNIS EL-MANAR
ET L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

en vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR EN BIOLOGIE-SANTE
Spécialité : "Biologie de l'environnement, des populations, écologie"

Écoles Doctorales : STVST & SICMA

présentée par
Anis AMARA

Préparée aux laboratoires :
LTAC (EA 3880)
Laboratoire de Microbiologie (INSTM)
Laboratoire d'écotoxicologie (IFREMER)

Thèse soutenue le 21 juin 2012
devant le jury composé de :

Balkis BOUHAOUALA-ZAHAR
Professeur, Université de Tunis El Manar / *Rapporteur*

François GALGANI
Directeur de recherches, Ifremer Corse / *Rapporteur*

Annick HOURMANT
Professeur émérite, Université de Bretagne Occidentale / *Directeur de thèse*

Abdellatif BOUDABOUS
Professeur, Université de Tunis El Manar / *Directeur de thèse*

Françoise QUINIOU
Chercheur, Ifremer Brest

Monia EL BOUR
Chercheur, INSTM Salammbô

À l'âme de mon père Mohamed,

À ma mère Néjiba, à mes frères et mes sœurs

À tous les membres de ma belle famille

et à ma petite famille Narjes et Omar

Remerciements

C'est une habitude saine que de remercier au début d'un tel travail tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible. Même si dans mon cas, cette liste peut sembler plus longue que de coutume, c'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse. Je désire alors leur exprimer ma profonde gratitude.

J'exprime ma sincère gratitude à Mme Balkis Bouhaouala-Zahar et Mr François Galgani, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie bien pour le temps passé à la lecture et pour l'intérêt porté à mon travail.

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle de thèse entre l'Université de Tunis El-Manar et l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) au sein du Laboratoire de Microbiologie à l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM) à Salammbô, du Laboratoire de Toxicologie Alimentaire et Cellulaire (LTAC) à Brest et du Laboratoire d'Ecotoxicologie à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) à Brest.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et témoigner de ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse : Mme Annick Hourmant, Professeur émérite à l'Université de Bretagne Occidentale qui a consacré une quantité considérable de son temps précieux pour ma formation (et ce depuis mon Master) et m'a guidé, et apporté son aide scientifique tant en conseils qu'à l'orientation des essais et la correction du manuscrit de thèse. Je remercie également Mr Abdellatif Boudabous Professeur à l'Université de Tunis El-Manar pour avoir accepté de diriger cette thèse en me prodiguant de nombreux conseils et suggestions qui ont permis de mener à bien ce travail. Je leur exprime ma reconnaissance pour la confiance qu'ils ont eue en moi et pour m'avoir permis de vivre une expérience scientifique, et humaine très enrichissante.

Mes plus vifs remerciements vont également à : Dr. Monia El Bour, chercheur au Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National des

Sciences et Technologies de la Mer à Salammbô et Dr Françoise Quiniou, chercheur au Laboratoire d'écotoxicologie à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer à Brest, pour leur encadrement et leurs critiques constructives qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Je leur exprime mes profonds remerciements pour l'aide compétente qu'elles m'ont apportée et pour leurs encouragements tout au long de ce travail.

Je remercie sincèrement Mme le Professeur Dominique Parent-Massin, de m'avoir accueilli au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Alimentaire (LTAC),

Je tiens à remercier vivement le Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, le Ministère Français des Affaires Etrangères et Européennes ainsi que le Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne de leurs prises en charge pour effectuer les différents séjours en France et en Espagne dans le cadre de la préparation de cette thèse.

Je remercie Mme Asma Hamza, chercheur au Laboratoire du Milieu Marin à l'INSTM centre de Sfax de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens techniques et scientifiques afin de pouvoir réaliser mes expérimentations. Je remercie aussi mes collègues de l'INSTM centre de Sfax : Mme Hayet Sahraoui & Mme Mabrouka Mahfoudhi pour leur gentillesse, leurs contributions au travail de thèse et pour leurs encouragements et leur soutien.
Mes remerciements s'adressent aussi à Mr Sabri Messoudi et Mr Fourat Akrout, chercheurs à l'INSTM centre La Goulette pour avoir accepté d'effectuer les dosages des sels nutritifs.

Je tiens à remercier Mr le Professeur Ricardo Beiras, Directeur de La Estación de Ciencias Mariñas de Toralla (ECIMAT) à Vigo en Espagne de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'écotoxicologie et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens humains, scientifiques et matériels nécessaires à la réalisation de mes expérimentations. Par la même occasion j'exprime ma profonde gratitude aux collègues et amis de l'ECIMAT à l'île de Toralla de l'Université de Vigo : Lazhar, Diego, Damián et à tous les membres du laboratoire d'écotoxicologie pour leur particulière disponibilité et leur soutien ainsi que

pour les nombreuses discussions que nous avons eues, et qui m'ont permis de surmonter bon nombre de questions au cours de la réalisation des bio-essais.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Gaël Durand, Directrice d'IDHESA Bretagne Océane, pour avoir accepté d'effectuer les contrôles des concentrations des solutions mères de pesticides.

Je remercie également tous mes collègues du LTAC : Monique, Nolwenn, Yann,… ainsi que mes collègues du Laboratoire de Microbiologie à l'INSTM : Radhia, Amel, Selma, … pour leur soutien, leur sympathie et leurs encouragements.

Merci aux trois stagiaires qui ont participé aux travaux de recherche menés pendant cette thèse : Cyrielle, Nassur et Géraldine. C'est avec plaisir que j'ai travaillé en votre compagnie. Cela m'a beaucoup enrichi. Merci beaucoup pour votre contribution à ce travail de thèse.

Je ne peux finir ces remerciements sans dire merci à ma famille : ma mère Néjiba, mes frères et sœurs et leurs enfants. Je ne trouve pas de mots pour définir ce que je ressens pour vous si ce n'est que je suis très heureux lorsqu'on est ensemble.
J'ai une pensée toute particulière pour toi Mon père qui, malgré ton absence, me donne tous les jours la force et le courage de prendre la vie du bon côté et de toujours voir la réalité de façon positive.

Enfin, je remercie ma chère épouse pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second.

Table des matières

Introduction générale et objectifs de l'étude *10*

CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE *14*

I. Les produits phytosanitaires *14*

1. Définition 14

2. Composition 14

3. Histoire : une consommation planétaire 15

4. Contexte des traitements phytosanitaires 16

4.1. Les pesticides en Tunisie 16

4.2. Cadre réglementaire 18

5. Les risques liés à l'application des pesticides 20

II. Types d'essais utilisés pour la caractérisation des effets écotoxicologiques en milieux aquatiques *21*

1. Les bio-essais mono-spécifiques 23

1.1. Bio-essais normalisés et organismes tests en milieu aquatique 23

1.2. Bio-essais non-normalisés 24

2. Bio-essais pluri-spécifiques 25

2.1. Microcosmes et mésocosmes 25

2.2. Quelques exemples de bio-essais pluri-spécifiques 26

III. Contaminants chimiques étudiés *27*

1. Époxiconazole 28

1.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action 28

1.2. Toxicité et devenir dans l'environnement 28

2. Chlorpyriphos-éthyl 30

2.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action 30

2.2. Toxicité et devenir dans l'environnement 30

3. Nonylphénol 32

3.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action 32

3.2. Toxicité et devenir dans l'environnement 32

CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES *35*

I. Préparation des substances testées *35*

1. L'eau de mer de référence 35

2. Les contaminants 36
2.1. Le toxique de référence 36
2.2. Les substances et formulations testées 36

II. Les bio-essais sur le phytoplancton 38

1. Tests micro-algues 39
1.1. Espèces bio-indicatrices 39
1.2. Composition des milieux de culture et protocoles expérimentaux des tests 41
1.3. Etude physiologique et dosages biochimiques 44

2. Tests sur les communautés naturelles de phytoplancton 48
2.1. Origine des communautés phytoplanctoniques testées 48
2.2. Déroulement du bio-essai et protocole des expérimentations 50

III. Les bio-essais sur les animaux 53

1. Test oursin 54
1.1. Description et mode de vie 54
1.2. Reproduction et développement embryo-larvaire 55
1.3. Le bio-essai oursin 55

2. Tests sur bivalves 56
2.1. L'huître creuse (*Crassostrea gigas*) 57
2.2. La palourde (*Ruditapes philippinarum*) 60

3. Test poisson 64
3.1. Description et mode de vie 64
3.2. Reproduction et développement larvaire 65
3.3. Le bio-essai Turbot 65

IV. Traitement statistique des données 68

CHAPITRE III : EFFET DES CONTAMINANTS CHIMIQUES SUR LES MICRO-ALGUES MARINES 69

I. Etude de l'effet de l'époxiconazole 69

1. Comparaison de l'effet de l'époxiconazole sur la croissance des trois microalgues . 69
1.1. Effet de l'époxiconazole (substance active) 69
1.2. Action de la formulation commerciale Opus 70

2. Effet de l'époxiconazole (Opus) sur quelques paramètres physiologiques 70
2.1. Effet sur la cinétique de croissance de *C. calcitrans* 71
2.2. Détermination du taux de croissance (μ) 72
2.3. Détermination de la CE_{50} 73
2.4. Effet sur la teneur en pigments 73
2.5. Effet sur la teneur en ATP 76
2.6. Effet sur la photosynthèse et la respiration 78
2.7. Effet sur le volume cellulaire 82

3. Action de l'époxiconazole (Opus) ajouté à différents stades de croissance 83
3.1. Effet sur la croissance 83
3.2. Effet sur les échanges gazeux 85

3.3. Effet sur la teneur en pigments 86
3.4. Effet sur la teneur en ATP 88

II. Etude de l'effet du nonylphénol 89

1. Comparaison de l'effet du nonylphénol sur la croissance de trois microalgues 89

2. Effet sur la croissance de *C. calcitrans* 89

3. Effet sur la teneur en pigments 90

4. Effet sur la teneur en ATP 91

5. Effet sur la vitesse de la photosynthèse et de la respiration 92
5.1. Action aiguë 92
5.2. Action chronique 94

6. Effet sur le volume cellulaire 96

III. Discussion 98

CHAPITRE IV : EFFET DES CONTAMINANTS CHIMIQUES SUR LES COMMUNAUTES NATURELLES DU GOLFE DE GABES 107

I. Effet des contaminants chimiques sur les populations naturelles de phytoplancton du golfe de Gabès (Décembre 2008) 107

1. Effets des contaminants sur la composition des populations de phytoplancton du golfe de Gabès 107
1.1. Composition de la population naturelle 107
1.2. Influence des contaminants à 6 j de culture 108
1.3. Influence des contaminants à 11 j de culture 110

2. Effet des contaminants sur la teneur en chlorophylle a 112

3. Effet des contaminants sur la teneur en sels nutritifs 114
3.1. Action sur la teneur en azote total et en phosphore 114
3.2. Action sur la teneur en $Si(OH)_4$ 115

II. Effet des contaminants sur la croissance de K. selliformis 116

1. Effet du chlorpyriphos-éthyl (Dursban) 116

2. Effet de l'époxiconazole (Opus) 117

3. Effet du nonylphénol 117

4. Effet du mélange chlorpyriphos-éthyl (Dursban) + époxiconazole (Opus) 118

III. Effet des contaminants sur la communauté de diatomées 119

1. Effet du chlorpyriphos-éthyl (Dursban) 119

2. Effet de l'époxiconazole (Opus) 120

3. Effet du nonylphénol 121

4. Effet du mélange chlorpyriphos-éthyl (Dursban) + époxiconazole (Opus).....122

IV. Discussion ***123***

CHAPITRE V : EFFET DES CONTAMINANTS CHIMIQUES SUR LES ANIMAUX MARINS ***127***

I. Etude de la toxicité des contaminants sur les différents modèles animaux ***127***

1. Effet sur le développement embryo-larvaire de l'oursin (*P. lividus*).....127

2. Effet des contaminants sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse *(C. gigas)*.....128

2.1. Détermination des CSEO et CE_{50} 128

2.2. Effet des contaminants sur le pourcentage brut d'anomalies 128

3. Etude de la toxicité des contaminants sur la palourde japonaise (*R. philippinarum*) 131

3.1. Effet sur le développement embryo-larvaire..... 131

4. Effet sur la métamorphose des larves de la palourde (*R. philippinarum*).....134

4.1. Détermination des CSEO et CE_{50} 135

4.2. Effet des contaminants sur le déroulement de la métamorphose..... 135

5. Effet sur la croissance du naissain de palourde.....139

6. Etude de la toxicité des contaminants sur les œufs et les larves du turbot (*P. maxima*) 140

6.1. Effet sur l'éclosion des œufs de turbot 140

6.2. Effet sur la survie des larves de turbot..... 140

II. Action directe et indirecte via l'alimentation des contaminants sur le naissain de palourde ***141***

1. Action directe.....142

1.2. Effet sur la cinétique de croissance du naissain 142

1.3.Effet des contaminants sur la consommation d'algues par le naissain de palourde 145

2. Action indirecte des contaminants *via* la contamination de l'algue fourragère *T-iso* sur le naissain de palourdes 148

2.1. Effet sur la croissance du naissain 148

2.2. Effet de la contamination des algues fourrage sur leur consommation par le naissain 150

III. Discussion ***153***

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES ***159***

BIBLIOGRAPHIE ***164***

LISTE DES ABREVIATIONS ***198***

TABLE DES ILLUSTRATIONS ***201***

Introduction générale et objectifs de l'étude

Parmi les multiples facteurs qui déterminent la santé humaine et le développement des pathologies, la qualité des milieux (air, eau, sol…), les contaminants (biologiques, chimiques, physiques) jouent un rôle fondamental. En effet, il apparaît que certaines pathologies sont aggravées, voire déterminées, par l'environnement et l'approfondissement des connaissances sur le rôle de l'environnement sur la santé constitue un enjeu scientifique majeur.

Depuis le début du XX^{ème} siècle, l'environnement (atmosphérique, terrestre et aquatique) a été soumis à la pression croissante des activités industrielles et humaines. Les contaminants rejetés dans l'environnement finissent par se retrouver plus ou moins rapidement dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens et côtiers où ils peuvent avoir des effets à court et à long terme (Burton, 1992). Le milieu marin et plus particulièrement les zones côtières sont soumis à toutes sortes de pollutions d'origine terrigène et marine. Les pollutions anthropiques dues aux apports de substances chimiques par le vecteur des voies fluviales, des vents, de l'air en basse altitude ou des rejets directs, sont les principales sources de dysfonctionnement des écosystèmes marins.

Les produits phytosanitaires sont utilisés de façon courante et en quantité croissante dans le monde depuis des années. En Europe, l'obligation réglementaire d'homologation de ces produits découle de la directive 91/414 : "Considérant que, au moment de l'autorisation des produits phytopharmaceutiques, il est nécessaire de s'assurer que, lors d'un usage approprié au but poursuivi, ils sont suffisamment efficaces et n'exercent aucun effet inacceptable sur les végétaux ou les produits végétaux, aucune influence inacceptable pour l'environnement en général et, en particulier, aucun effet nocif sur la santé humaine ou animale ou sur les eaux souterraines". Or, les pollutions diffuses d'origine agricole dues aux produits phytosanitaires sont souvent mises en cause dans la

pollution des milieux aquatiques. Caractériser les risques occasionnés par ces polluants sur un écosystème revient à étudier le danger de la substance et ses effets toxiques sur les composantes de l'écosystème (Sutter, 1993).

L'évaluation écotoxicologique porte sur le fonctionnement de l'écosystème tel que déterminé par la survie et le bien-être de toutes les espèces dans un écosystème spécifique. Il est supposé que la protection des espèces protège la structure des écosystèmes et donc leur fonctionnement.

Au sein des écosystèmes sont présentes simultanément des espèces animales et végétales appartenant à différents niveaux trophiques :

- producteurs primaires (assurant leur développement à partir du gaz carbonique, de l'eau et des sels minéraux et utilisant la lumière comme source d'énergie) ;
- consommateurs primaires (herbivores) ;
- consommateurs secondaires (carnivores) ;
- décomposeurs (utilisant la matière organique morte dont ils assurent une minéralisation progressive).

Dans un écosystème naturel, les diverses espèces présentes sont en relation les unes avec les autres (relations intra et interspécifiques telles que compétition, commensalisme, symbiose, prédation, etc…) et la disparition ou la diminution de la densité d'une espèce donnée peut entraîner des bouleversements importants dans l'ensemble de la biocénose.

Ces raisons alliées à des différences de pollu-tolérance entre espèces d'un même niveau trophique, voire d'une même classe font qu'il faudrait théoriquement étudier les effets toxiques potentiels des contaminants chimiques vis-à-vis de l'ensemble des êtres vivants peuplant un écosystème donné.

En pratique, il n'est pas envisageable de réaliser des expérimentations sur l'ensemble des espèces et, dans ces conditions, le choix des espèces considérées ne peut résulter que d'un compromis entre représentativité et faisabilité.

L'adaptation du Technical Guidance Document (TGD) au milieu marin fait office de seule référence pour ce qui est de l'analyse écotoxicologique appliquée au milieu marin. L'évaluation du danger des substances et produits mis sur le marché recommandée par le TGD porte sur six niveaux trophiques : bactéries, phytoplancton, crustacés, mollusques, échinodermes et poissons. Quatre de ces niveaux ont été abordés dans ce travail de thèse à savoir : phytoplancton, échinoderme, mollusques et poisson.

Le présent travail porte essentiellement sur le degré de pollu-sensibilité des organismes dominants et d'importance écologique pour l'écosystème côtier. Il présente une étude de l'évaluation de la toxicité potentielle de contaminants chimiques sur des organismes végétaux et animaux marins. Les bio-essais réalisés sur le phytoplancton marin ont été conduits dans des conditions de culture similaires à celles rencontrées dans le golfe de Gabès (Tunisie) afin d'évaluer la sensibilité des espèces de microalgues testées en fonction de plusieurs paramètres abiotiques. Conjointement, une étude a porté sur les populations naturelles du golfe de Gabès afin d'apprécier l'effet des contaminants chimiques sur les espèces de microalgues présentes. En application des recommandations du TGD, ce travail comporte une évaluation de la sensibilité de quelques espèces animales marines appartenant à des niveaux trophiques distincts vis-à-vis des contaminants chimiques étudiés en exposition directe ou par empoisonnement secondaire.

La présente étude s'articule en cinq chapitres. Le chapitre I est consacré à une synthèse bibliographique sur les pesticides, en rappelant leur grande abondance dans l'environnement et les écosystèmes aquatiques. Dans un second temps, une présentation des outils disponibles pour évaluer les risques écotoxicologiques a été abordée. Le chapitre II regroupe les différentes techniques biologiques et biochimiques mises en œuvre tout au long de ce travail. Dans une troisième partie (chapitre III), l'ensemble des résultats concernant l'étude de la toxicité des contaminants sur la croissance des micro-algues et, certains paramètres physiologiques ont été détaillés. Le chapitre IV est consacré à une étude portant sur l'action des contaminants vis-à-vis de communautés phytoplanctoniques naturelles du golfe de Gabès. Le chapitre V porte sur l'évaluation de la toxicité des contaminants chimiques vis-à-vis d'animaux marins appartenant à quatre niveaux trophiques pour lesquels différents stades du développement ont été testés.

Le choix de travailler sur des espèces phytoplanctoniques du golfe de Gabès et des espèces d'invertébrés et de poisson vivant dans les côtes sud Méditerranée a pour objectif de développer un panel d'organismes tests spécifiques à l'environnement tunisien. Concernant les substances actives et/ou co-formulants et les formulations commerciales de pesticides étudiés, leur choix a été guidé par leur mode d'action et par l'importance de leur utilisation au niveau tunisien.

CHAPITRE I

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La deuxième moitié du XX^{ème} siècle a été marquée par une intensification et une modernisation de l'agriculture qui ont abouti à une utilisation massive des pesticides afin d'obtenir un résultat rapide, avec un maximum d'efficacité. En France, 71 600 tonnes de substances actives ont été vendues en 2006 (UIPP, 2007) ce qui la place comme le troisième consommateur mondial de pesticides et le premier utilisateur en Europe (Aubertot *et al*., 2005). Les conséquences visibles de cette évolution se sont aussi accompagnées d'une contamination par ces molécules toxiques et d'une pollution croissante des cours d'eau et par conséquent du milieu côtier.

I. Les produits phytosanitaires

1. Définition

Les pesticides, appelés également produits phytosanitaires, produits phytopharmaceutiques, agropharmaceutiques ou produits de protection, sont des poisons destinés à tuer ou repousser les adventices (herbicides), les insectes (insecticides), les champignons (fongicides), ou à se débarrasser de divers animaux considérés comme nuisibles (nématicides, rodonticides …).

2. Composition

Un pesticide est composé de deux types de substances :

- une ou plusieurs substances actives : les substances actives sont définies par la directive 91/414/CEE du 15 juillet 1991, comme des substances ou micro-organismes, y compris les virus exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux. Ce sont ces substances qui confèrent au produit l'effet désiré. Quelques exemples de substances

actives présentes dans les formulations commerciales : l'époxiconazole retrouvé dans la formulation commerciale du fongicide Opus®, le glyphosate présent dans de très nombreux désherbants totaux (Roundup®, Rascal®, Glypro®, …), la bentazone dans des désherbants de céréales (Basamaïs…), le chlorpyriphos-éthyl, insecticide du Dursban®, …
- un ou plusieurs additifs ou adjuvants : ces co-formulats renforcent l'efficacité (épaississants, solvants, agents mouillants tels que les dérivés du nonylphénol …) (substances apprétentes …) et la sécurité du produit (répulsifs, vomitifs…). Il peut aussi y avoir des attractants.

La formulation du pesticide correspond à la forme physique sous laquelle le produit phytopharmaceutique est mis sur le marché ; obtenue par le mélange des substances actives et de formulants, elle se présente sous une multitude de formes, solides ou liquides.

3. Histoire : une consommation planétaire

L'utilisation des pesticides en agriculture remonte à l'antiquité. De tout temps les êtres humains ont cherché à protéger leurs cultures des ravages de la nature. Ainsi, Homère mentionnait l'usage du soufre comme fumigant et Pline l'Ancien de l'arsenic comme insecticide (Lhoste et Grison, 1989 ; Colin, 2000). En 1681, l'utilisation des dérivés de l'arsenic fut conseillée pour protéger les végétaux (Lhoste et Grison, 1989) mais les premières tentatives de traitement chimique des cultures ne furent conduites qu'au XVIIIème siècle, lors de la première révolution agricole. L'emploi des pesticides en agriculture ne prit véritablement son essor que vers la fin du XIX^{ème} siècle et la première moitié du XX^{ème} siècle.

Ce ne fut véritablement qu'avec le développement de la chimie de synthèse dans les années 1930-40, que se développèrent des outils efficaces de lutte contre les ravageurs, les adventices et les maladies des cultures. Ainsi, dès 1940, des désherbants sélectifs pour les céréales, comme le pentachlorophénol et les xanthates 01112s, furent synthétisés. A cette époque, furent aussi découverts les premiers herbicides auxiniques appartenant au groupe des phénoxy-acétiques (2,4-D, 2,4,5-T et MCPA) qui conduisirent à la mise au point des premiers herbicides systémiques et sélectifs pour les dicotylédones (Lhoste et Grison, 1989). Dans les années 1950, furent identifiées les propriétés herbicides de la

famille des triazines, qui connurent un succès important auprès des agriculteurs. La gamme des pesticides disponibles s'est alors rapidement diversifiée et leur usage a connu un très fort développement au cours des décennies suivantes. Ainsi, de 1945 à 1985, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans. Les pesticides ont constitué un énorme progrès dans la maîtrise des ressources alimentaires, mais leur usage intensif et leur persistance dans l'environnement a conduit à des phénomènes de résistance chez les plantes (Powles et Holtum, 1994 ; Lorraine-Colwill *et al*., 2003 ; Holmes, 2010 ; Walker *et al*., 2011), mais aussi chez les insectes (Haubruge et Amichot, 1998) et engendré des troubles de la reproduction et du développement chez les animaux (Soso *et al*., 2007 ; Grote *et al*., 2008 ; Stefanidou *et al*., 2009). Ceci montre les limites et les dangers de ces substances pour l'environnement, pour les écosystèmes (Margni *et al*., 2002 ; Kielak *et al*., 2011) mais également pour les êtres humains (Alavanja *et al*., 2004 ; Knopper et Lean, 2004 ; Kamel *et al*., 2007).

4. Contexte des traitements phytosanitaires

4.1. Les pesticides en Tunisie

La Tunisie est un pays à vocation agricole, les terres agricoles sont estimées à 4 316 millions d'hectares. L'intensification de l'agriculture s'est traduite par le développement de systèmes de culture «intensifs», fondés sur la recherche de hauts rendements et un recours aux pesticides. Le nombre de produits commercialisés est de l'ordre de 725 et plus, correspondant à 330 substances actives (Tableau 1).

Tableau 1 : Nombre de substances actives et formulations commerciales pour chaque type de pesticide importé en Tunisie (Rapport Pan Africa 2006)

Pesticides	Substances actives	Formulations commerciales
Fongicides	143	312
Insecticides	102	259
Herbicides	76	135
Raticides	9	19
Total	330	725

Les données de l'Institut National des Statistiques (INS, 2008) montrent que la moyenne des importations annuelles de pesticides entre 1999 et 2006 s'élève à 3 750 tonnes par an

(Figure 1). Ces quantités sont utilisées principalement en agriculture (environ 95 %) pour une superficie traitée d'environ 761 000 ha/an soit près de 5 kg/ha. Á titre de comparaison, la quantité utilisée en France s'élève à 110 000 tonnes par an pour une surface cultivée de 295 000 km^2 (soit 3,7 kg/ha en moyenne). Selon la Direction Générale des Pêches et d'Aquaculture (DGPA), l'utilisation de ces quantités se répartit entre la céréaliculture, avec une part de 63 %, l'arboriculture avec 16 % et le maraîchage avec 21 %, (DGPA, 2008).

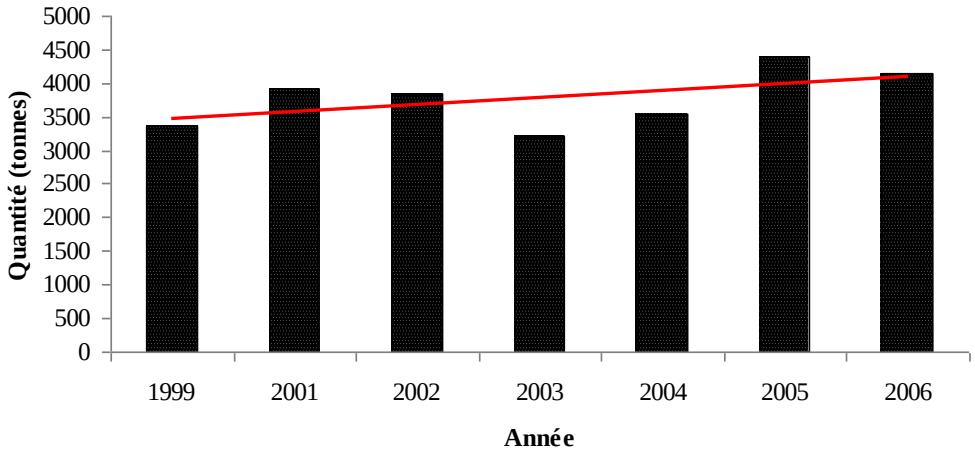


Figure 1 : *Evolution des importations de pesticides en Tunisie entre 1999 et 2006 (Source Pan Africa, 2006)*

Les données des enquêtes de la Direction Générale des Etudes et du Développement Agricole (DGEDA, 2006) du Ministère de l'Agriculture relatives à l'occupation des sols montrent une répartition équilibrée entre les cultures basses (51 %) et l'arboriculture (49 %), constituée à 78 % par des oliveraies. Selon le Centre Technique de l'Agriculture Biologique de Tunisie, les exploitants oléicoles sont en grande partie engagés dans une démarche de réduction, voire de non utilisation des pesticides pour l'entretien des oliveraies. Il en résulte donc que la plus grande partie des superficies traitées en Tunisie est occupée par des cultures basses qui sont à 73 % des céréales, soit 459 000 ha. Les traitements de la culture de blé (un traitement fongique et un à un traitement et demi d'herbicides pour le désherbage) représentent l'opération la plus consommatrice de pesticides en Tunisie.

En plus des importations annuelles de pesticides, les stocks périmés (1 200 tonnes) constituent une menace réelle pour la santé humaine et pour l'environnement, situation qui ne peut que s'aggraver car le pays ne dispose pas d'installations adéquates de

destruction des déchets dangereux et souffre d'un manque de formation en matière de stockage et d'utilisation correcte des pesticides.

4.2. Cadre réglementaire

Au niveau mondial, les premières dispositions législatives sur le contrôle des pesticides datent de 1943 (loi n°525 du 2 novembre 1943). En France, le décret d'application (décret 74/682 du 1er août 1974) a créé «la commission d'étude de la toxicité des produits anti-parasitaires à usage agricole et assimilés» avec pour mission de donner un avis sur le risque que représente chaque produit phytosanitaire pour l'utilisateur, le consommateur et l'environnement. La transcription en droit français (décret 94-359 du 5 mai 1994) de la directive 91/414/CE, visant à harmoniser les conditions d'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), a fait évoluer les principes et les modalités de contrôle des pesticides commerciaux ou produits phytosanitaires. L'article 7 stipule ainsi que l'AMM d'un produit phytosanitaire est délivrée si ces substances actives sont inscrites sur une liste communautaire spécifique et si l'innocuité du produit pour la santé publique, l'environnement ainsi que son efficacité et sa sélectivité, indiquées par le fabricant, sont vérifiées par des études agronomiques, toxicologiques et écotoxicologiques.

L'évaluation en vue de la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et de l'approbation des substances actives qui les composent est strictement encadrée et harmonisée au niveau européen. Régie depuis 1993 par la directive européenne 91/414/CEE, l'évaluation des produits et substances phytopharmaceutiques a évolué en juin 2011 avec l'entrée en vigueur du règlement (CE) N°1107/2009. Ce règlement fait partie du « Paquet pesticide » adopté en octobre 2009. L'évaluation se décompose en deux étapes : la première, réalisée au niveau européen, porte sur les dangers et les risques liés aux substances actives entrant dans la composition des produits phytopharmaceutiques. La seconde évalue les intérêts et les risques liés aux préparations commerciales et est réalisée au niveau de zones géographiques.

La Commission européenne a adopté, en juillet 2002, une communication dans laquelle elle expose une nouvelle stratégie visant à réduire l'impact des pesticides sur l'environnement et la santé humaine. La communication, intitulée "Vers une stratégie

thématique concernant l'utilisation durable des pesticides", se donne les objectifs suivants :

- réduire au minimum les dangers et les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation des pesticides ;
- renforcer les contrôles portant sur l'utilisation et la distribution des pesticides ;
- réduire les niveaux de substances actives nocives, notamment en remplaçant les plus dangereuses d'entre elles par des substances plus sûres (entre autres par des substituts non chimiques) ;
- favoriser la conversion à une agriculture utilisant des quantités limitées ou nulles de pesticides ;
- mettre en place un système transparent de notification et de suivi des progrès accomplis, et notamment définir des indicateurs appropriés.

En France, à la suite du Grenelle de l'environnement, le plan Ecophyto 2018 a été mis en place en 2008 et prévoit, dans le cadre de huit axes de travail, de réduire de 50 % l'usage des pesticides au niveau national dans un délai de dix ans. En complément du retrait du marché des produits phytopharmaceutiques comprenant les substances actives les plus préoccupantes, le plan d'action Ecophyto 2018 a prévu dans son 5ème axe de renforcer les réseaux de surveillance sur les bio-agresseurs et sur les effets indésirables de l'utilisation des pesticides sur les cultures et l'environnement et de réduire et sécuriser l'usage des produits phytopharmaceutiques en zone non agricole (Axe 7).

En Tunisie, le secteur des pesticides est très pauvre en matière de réglementation. Le seul texte existant est le décret n° 2002-3469 qui fixe simplement les modalités et les conditions d'obtention de l'homologation et de l'autorisation de vente des pesticides. Les seules réglementations en place concernent la qualité de l'air ambiant et portent surtout sur les polluants d'origine industrielle et suivent les normes NT 106; 004 (1994) et NT 106; 005 (1995).

En ce qui concerne la protection de l'homme et de l'environnement, la norme de rejets industriels dans le milieu hydrique est une norme NT 106 ; 02 qui date depuis 1989, elle est homologuée c.a.d d'application obligatoire pour tous types de rejets concernent tout type d'industrie (tanneries, textiles, agroalimentaire, etc ...). Bien qu'il y ait eu plusieurs dérogations, la tendance actuelle va vers l'adoption de limites de rejets par secteur

d'activité industrielle. En réponse à l'harmonisation internationale, cette norme est remplacée par une réglementation nationale et le ministère de l'environnement a élaboré un décret ou arrêté relatif aux rejets dans le milieu hydrique indépendamment du contenu de la norme 106 ; 02.

5. Les risques liés à l'application des pesticides

L'utilisation croissante des pesticides depuis un demi-siècle a eu des impacts délétères sur la santé de l'homme et l'environnement.

En 2006, une étude réalisée par la banque mondiale et le Pesticide Action Network (PAN, 2006), indique que, dans la seule région de Tunis, 44 décès liés aux pesticides ont été recensés entre 1976 et 1986. Ce chiffre est à l'heure actuelle certainement beaucoup plus important, en particulier dans les zones à vocation agricole. Kallal *et al.* (1990) et Ennaceur *et al.* (2004) ont montré au Nord de la Tunisie (zone à vocation céréalière) une contamination générale du lait maternel par les pesticides organochlorés (POC). Dans une étude épidémiologique menée dans trois secteurs concernés par les pesticides (agriculture, municipalités et distribution), Mansour *et al.* (2003) ont mis en évidence la présence d'une symptomatologie évocatrice d'une intoxication par les produits pesticides dans 65 % des cas.

Dans une étude de la région de Bizerte, Hamza *et al.* (2004), ont montré que la nappe phréatique de la plaine côtière de Metline-Ras Jebel-Raf Raf est relativement vulnérable à la pollution par les pesticides, région où l'activité agricole est prédominante.

D'après Bahrouni (2010), l'agriculteur tunisien, faute de disposer de méthodes de traitement suffisamment précises, dans la pratique, privilégie souvent les modes de traitement garantissant le maximum de production, ce qui a de lourdes conséquences sur l'environnement. En effet, une grande proportion des pesticides appliqués est dispersée dans l'atmosphère, dans le sol et dans les eaux de surface, pendant et après le traitement, seule une faible proportion des gouttelettes pulvérisées est retenue à la surface des feuilles. Les principaux mécanismes de transfert des pesticides vers les différents compartiments de l'environnement sont schématisés dans la figure 2.

En France une étude de l'IFEN (2006) montre que 96 % des eaux de surface et 61 % des nappes phréatiques contiennent des pesticides et ceci après des décennies d'agriculture industrielle polluante, des millions de tonnes de pesticides déversés sur les cultures, intégrant toutes les composantes de la biosphère : eau, sol, air, végétation, animaux et homme. Il en résulte une pollution des eaux côtières qui constitue un danger potentiel pour les organismes marins non ciblés (Figure 2).

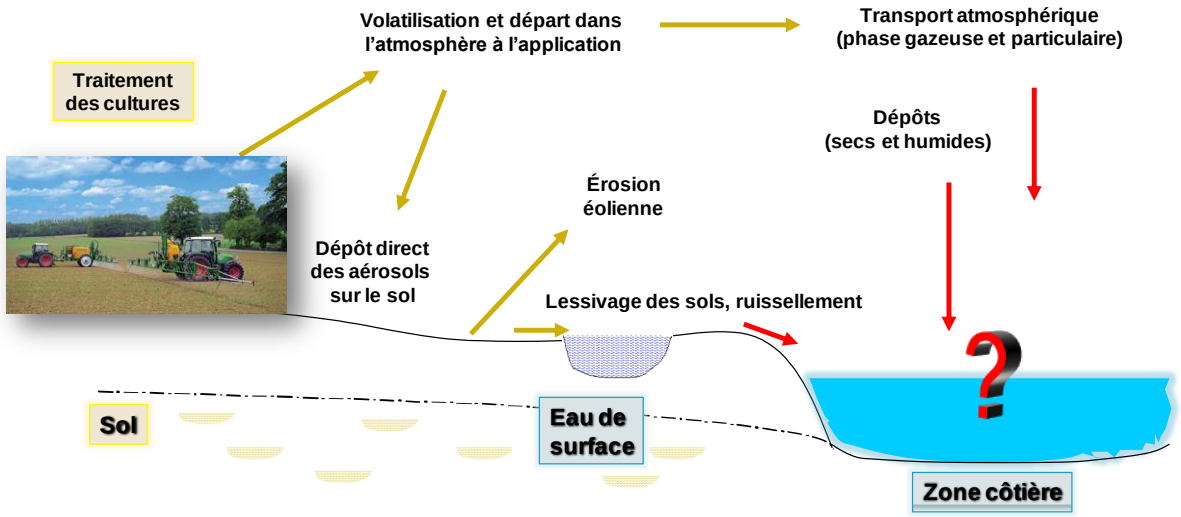


Figure 2 : *Processus de transfert des pesticides vers les différents compartiments de l'environnement (selon L'hermite et al., 2008 modifié).*

Si les quantités pulvérisées de bouillie bordelaise, qui est un pesticide (algicide et fongicide) fabriqué par neutralisation d'une solution de sulfate de cuivre par de la chaux éteinte, apparaissent être en constante diminution dans plusieurs pays (INERIS, 2005), elles restent encore élevées en Tunisie. A titre de comparaison, le volume moyen appliqué pour les grandes cultures en France et en Allemagne est respectivement de 150 et de 200 L/ha, alors qu'en Tunisie il est de l'ordre de 300 L/ha.

II. Types d'essais utilisés pour la caractérisation des effets écotoxicologiques en milieux aquatiques

L'évaluation des effets toxiques potentiels des contaminants chimiques vis-à-vis de la flore et de la faune marine est en partie basée sur la réalisation en laboratoire d'essais de toxicité.

L'objectif d'un bio-essai est de détecter, dans des conditions expérimentales précises, l'écotoxicité potentielle d'une substance chimique ou de tout autre échantillon vis-à-vis des organismes vivants.

Ces essais permettent de déterminer les concentrations induisant 10, 20, …, 50 voire 100 % d'effet recherché ainsi que la plus forte concentration n'induisant pas d'effet délétère, et ceci en fonction de la durée d'exposition.

Les tests sont classés selon le type d'exposition : aiguë ou chronique, mais aussi selon le niveau d'observation des effets. Ils peuvent être intracellulaire (enzymatique, génétique …), cellulaire, au niveau de l'organisme entier, au niveau des populations ou encore des communautés puis de l'écosystème. Différents critères d'effets peuvent être mesurés : mortalité, croissance, développement, reproduction, activités enzymatiques, génotoxicité, mutagénécité … (Calow, 1993 ; Forbes et Forbes, 1997).

Triffault-Bouchet (2004) distingue quatre types de tests :

- **Toxicité aiguë :** ce sont des essais à court terme (de quelques minutes, heures à quelques jours en fonction du cycle de vie de l'organisme), après exposition à une dose unique de substance. Ces essais permettent d'établir une relation entre la concentration d'exposition et l'intensité de l'effet, généralement exprimée par la DL_{50} (Dose Létale) ou la CE_{50} (Concentration Effective), pour lesquelles les effets sont observés pour 50 % des individus testés.

- **Toxicité chronique :** ces tests permettent de déterminer la toxicité chronique (à moyen ou à long terme) vis-à-vis de l'organisme test. La durée d'exposition correspondant en moyenne, à 10 % de la vie de l'organisme et doit intégrer plusieurs stades de son cycle de vie pouvant inclure la reproduction. Les essais à moyen et long terme permettent de déterminer une concentration expérimentale (CSEO = Concentration Sans Effet Observé ou en anglais NOEC : No Observed Effect Concentration), en dessous de laquelle aucun effet toxique n'est observé (AERMC, 2002 ; Triffault-Bouchet, 2004). Pour avoir une valeur de CSEO calculée, et non estimée uniquement avec la valeur de la concentration testée n'induisant pas d'effet, généralement il est recommandé de déterminer la valeur de la CE_{10} qui est retenue comme concentration sans effet.

- **Tests de génotoxicité :** permettent d'évaluer les capacités des polluants à produire des altérations de l'ADN, altérations qui induisent des mutations géniques et/ou des mutations chromosomiques (altération de la structure des chromosomes) (Triffault-Bouchet, 2004, Wessel *et al.*, 2007). Ces altérations sont la preuve d'une exposition et sont souvent réversibles, la transmission aux descendants n'est pas toujours systématique, mais ces altérations permettent d'identifier un risque génotoxique potentiel.

- **Tests type « perturbateurs endocriniens »** : fondés sur l'identification de marqueurs biologiques, capables de mettre en évidence l'effet « perturbateur endocrinien ». Ils sont utilisables à la fois dans le cadre de la caractérisation des substances et de la surveillance des milieux et sont appuyés sur des méthodes de culture cellulaires *in vitro* (Ineris, 2009).

1. Les bio-essais mono-spécifiques

Les bio-essais mono-spécifiques sont des tests conduits en laboratoire au cours desquels des organismes d'une seule espèce sont exposés à un milieu (une substance, un produit, une solution, un rejet, voire des mélanges…). Ces essais sont menés dans des conditions contrôlées de lumière, salinité, température, milieu de culture ou support d'élevage et font l'objet de protocoles standardisés ou mieux d'une normalisation (nationale, européenne ou internationale). La standardisation et la reproductibilité des effets observés, permettent d'obtenir une information fiable sur le phénomène de toxicité (Taub, 1989 ; AERMC, 2002 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; Volatier, 2004 ; Clément, 2006).

1.1. Bio-essais normalisés et organismes tests en milieu aquatique

Les bio-essais normalisés existants concernent les végétaux (graminées, micro ou macro-algues,…) et les organismes procaryotes tels que les bactéries ou les animaux eucaryotes invertébrés tels que les crustacés … et vertébrés tels que les poissons.

Quelques exemples d'organismes utilisés pour la conduite des bio-essais monospécifiques et des critères d'effets suivis sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Exemples d'organismes tests utilisés en milieu aquatique pour la caractérisation des effets écotoxicologiques (liste non exaustive) (Angerville, 2009)

Niveau de toxicité	Organisme	Critère d'effet
Aiguë	Bactérie (marine)	Luminescence
	Daphnie	Immobilité
	Cériodaphnie	Immobilité
	Rotifère (marin ou eau douce)	Survie
	Copépode (marin et eau douce)	Survie
	Poisson	Survie
Chronique	Daphnie	Reproduction
	Cériodaphnie	Reproduction
	Rotifère	Reproduction
	Copépode	Reproduction
	Ostracode	Mortalité et croissance
	Algue (marine ou eau douce)	Croissance de la population, activité enzymatique
	Lentille d'eau	Croissance

1.2. Bio-essais non-normalisés

Des protocoles peuvent être employés en utilisant des organismes autochtones ou des organismes tests (micro-algues, rotifères, crustacés…), que l'on peut trouver commercialisés sous la forme de Toxkit™. Ce type de protocole a été utilisé par de nombreux chercheurs (Do Hong, 2001 ; Lopes *et al.*, 2007 ; Wu *et al.*, 2007 ; Oleszczuk, 2008). Les Toxkits™, largement utilisés en routine, permettent de réaliser des essais de toxicité sur différentes espèces (*Daphnia carinata, Daphnia pulex, Ceriodaphnia*

quadrangular, Bosmina longirostris et *Simocephalus vetulus*) (Wu *et al.*, 2007) et sont basés sur une miniaturisation et une standardisation des essais de toxicité classiques. Les résultats obtenus sont, dans certains cas, pratiquement comparables à ceux obtenus au moyen d'organismes élevés en laboratoire (Janssen et Persoone, 1993 ; Persoone *et al.*, 1993 ; Sefrioui et Chergui, 2002 ; R-Biopharm France, 2006 ; Oleszczuk, 2008). Par ailleurs, ces études conduites au moyen de bio-essais non-normalisés, utilisant des organismes autochtones ou des Toxkits™, ont en général conclu, au caractère pertinent des résultats découlant de l'utilisation de ces outils.

2. Bio-essais pluri-spécifiques

L'évaluation du danger pour l'environnement (quelles que soient la ou les substances toxiques considérées), basée sur des tests mono-spécifiques, nécessite une validation à des niveaux de complexité biologique supérieure (Forbes et Forbes, 1997 ; Giuckert, 1996 ; Parent-Raoult, 2004). Une validation terrain à l'aide d'études *in situ* permet de mieux appréhender les impacts en conditions réelles d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxiques(s). Cependant, ces études nécessitent des équipements expérimentaux spécifiques et sont généralement très coûteuses et les résultats ne sont pas toujours évidents à exploiter car il est difficile de contrôler tous les paramètres comme pour les essais *in vitro* (Clément, 2006). En général l'effet observé est induit par l'ensemble des « contaminants » présent dans le milieu et il est alors difficile de déterminer le contaminant qui est responsable de l'effet observé.

2.1. Microcosmes et mésocosmes

Les microcosmes et les mésocosmes sont deux types de bio-essais pluri-spécifiques, qui permettent de travailler à un niveau de représentativité des écosystèmes supérieur à celui des essais mono-spécifiques (Kimball et Levin, 1985 ; Forbes et Forbes, 1997 ; Ramade, 2002). Ils permettent d'étudier simultanément les effets d'un ou de plusieurs polluants sur un grand nombre d'espèces, représentatives de plusieurs niveaux d'organisation trophiques (Cairns Jr *et al.*, 1990 ; Crossland et La Point, 1992 ; Cairns Jr et Cherry, 1993 ; Fliedner et Klein, 1996) et de diminuer les facteurs d'incertitude à appliquer pour évaluer la situation au niveau écosystémique (Crossland et La Point, 1992 ; Triffault-Bouchet, 2004). La différence entre les microcosmes et les mésocosmes est liée à leur taille et donc à leur complexité.

Toutefois, Cairns (1996) souligne que, contrairement aux bio-essais mono-spécifiques, les essais à l'échelle d'une communauté ou d'un écosystème présentent dans tous les cas une plus faible reproductibilité et un coût plus important. Selon Carpenter (1996), l'utilisation des résultats de microcosmes peut conduire à des erreurs d'appréciation importantes. Calow (1993) note pour sa part que les résultats d'un essai pluri-spécifique ne sont pas forcément plus généralisables que ceux d'essais mono-spécifiques.

2.2. Quelques exemples de bio-essais pluri-spécifiques

Peu d'essais en microcosmes et en mésocosmes se font dans des conditions standardisées et leur conception est variable selon, d'une part, les objectifs de l'étude (Crossland et La Point, 1992 ; Cairns et Cherry, 1993) et, d'autre part, l'écosystème récepteur simulé, lotique ou lentique (Triffault-Bouchet, 2004).

Tableau 3 : Exemples de microcosmes et de mésocosmes utilisés en milieu aquatique (Angerville, 2009).

Volume	Référence
150 mL	(Parent-Raoult, 2004 ; Volatier, 2004)
2 L	(Clément et Cadier, 1998 ; Cauzzi, 2007)
50 L	(Yang *et al.*, 1999)
84 L	(Hickley *et al.*, 1999)
100 L	(Triffault-Bouchet, 2004 ; Clément *et al.*, 2005 ; Cauzzi, 2007)
180 L (gravières)	(Clément, 2006)
600 L	(Van den Brink *et al.*, 2002)
5 000 L	(Merlin *et al.*, 1992 ; Merlin *et al.*, 2002)
5 000 L	(Seguin *et al.*, 2001)
30 000 L	(Caquet *et al.*, 1996)
50 000 L	(Crossland et Bennett, 1984)
Canaux artificiels	(Kreutzweiser *et al.*, 1995 ; Brunet, 2000 ; Parent-Raoult, 2004)
Rivières artificielles	(Belanger *et al.*, 2004 ; Volatier, 2004 ; Rier et Stevenson, 2006)

Il existe deux types de bio-essais pluri-spécifiques : les microcosmes de laboratoire (systèmes de taille restreinte sous conditions de température, d'éclairement et de photopériode contrôlées), les microcosmes extérieurs (mares expérimentales d'un volume d'eau inférieur à 15 m^3 ou rivière artificielle dont la longueur est inférieure à 15 m de long (Crossland et La Point, 1992 ; Caquet *et al.*, 1996) et les mésocosmes (systèmes artificiels extérieurs de volume d'eau supérieur à 15 m^3 pour les mares ou rivières artificielles dont la longueur est supérieure à 15 m (Crossland et La Point, 1992 ; Caquet *et al.*, 1996). Quelques études sont rapportées dans le tableau 3 montrant la variété des volumes utilisés.

III. Contaminants chimiques étudiés

Le choix de l'étude a porté sur trois substances : l'époxiconazole, le chlorpyriphos-éthyl et le nonylphénol.

L'époxiconazole a été choisi parmi les autres produits phytosanitaires de la famille des triazoles, en raison de la forte recommandation faite aux agriculteurs par les coopératives agricoles du ministère de l'agriculture, des ressources hydrauliques et de la pêche tunisien d'utiliser ce fongicide (Opus) dans plusieurs types de cultures, en traitements à la fois curatif et préventif.

La deuxième substance utilisée est l'insecticide chlorpyriphos-éthyl (en formulation Dursban) qui en Tunisie, est utilisé comme moyen de protection contre les insectes dans l'agriculture et plus particulièrement comme moyen de lutte anti-acridienne, en usage préventif et curatif pendant les épisodes d'invasions du criquet (Ammar *et al.*, 2004). Dans son rapport sur les opérations de lutte contre le criquet pèlerin, la FAO (2006) rapporte que, entre 2004 et 2006, 96 600 litres de chlorpyrifos ont été livrés en Tunisie.

La troisième substance étudiée est le nonylphénol qui, outre ses multiples utilisations dans plusieurs domaines (textile, peinture, plastique …), est également utilisé comme substance active, adjuvant ou co-formulant dans des produits phytopharmaceutiques (pesticides et biocides). Son utilisation dans les pesticides a été interdite en 2005 mais les autorisations d'emploi de pesticides peuvent perdurer plusieurs années (10 ans en France, cette interdiction ne prendra donc effet qu'en 2015).

1. Époxiconazole

1.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action

L'époxiconazole ou (2RS, 3SR)-1-[3-(2-chlorophényl)-2,3-époxy-2-(4-fluorophényl) propyl]-1H-1,2,4-triazole (CAS n° 133855-98-8), est un fongicide de la famille des triazoles. L'époxiconazole est présent à la concentration de 125 g/L dans la formulation commerciale appelée Opus® (BASF AGRO SAS) qui se présente sous la forme d'une suspension concentrée. C'est un fongicide systémique, à large spectre d'activité, utilisé pour éradiquer ou limiter le développement des champignons parasites dans les champs de céréales et les cultures porte-graine mineures (Ammermann *et al*., 1992 ; Schöfl et Zinkernagel, 1997 ; Bertelsen *et al*., 2001 ; Leroux, 2003). L'époxiconazole bloque la croissance des tubes germinatifs du champignon en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol, un des constituants de la membrane cellulaire, grâce à sa liaison au groupe hémique du cytochrome P450, cofacteur requis par l'enzyme C14 déméthylase (Gadher *et al*., 1983 ; Akers *et al*., 1990 ; Kwok et Loeffler, 1993 ; Leroux, 2003 ; Ballantyne, 2004). La perméabilité sélective des membranes est ainsi perturbée. En outre, en même temps qu'il agit comme fongicide, l'époxiconazole induit une suite d'adaptations morphologiques et physiologiques qui permet aux plantes traitées de tolérer de nombreux stress environnementaux tels que sécheresse, ozone, températures élevées et les traitements herbicides (Wu et von Tiedemann, 2001 & 2002 ; Percival et Noviss, 2008) ; cet effet protecteur des fongicides triazoles engendre un retard de la sénescence des plants et un meilleur rendement (Bertelsen *et al*., 2001 ; Wu et von Tiedemann, 2001 ; Percival et Noviss, 2008).

1.2. Toxicité et devenir dans l'environnement

Des travaux récents ont mis en évidence que l'époxiconazole agit comme un perturbateur endocrinien (Taxvig *et al*., 2007 ; Kjaerstad *et al*., 2010). Les fongicides conazoles sont connus pour influencer l'activité des enzymes nécessitant du cytochrome P450, et un exemple en est l'inhibition de l'activité de l'aromatase (CYP19), impliquée dans la conversion des androgènes en œstrogènes (Sanderson *et al*., 2002 ; Kjaerstad *et al*., 2010). Il en résulte chez le rat une perturbation du développement reproductif : allongement de la durée de gestation, virilisation, mort du fœtus… (Taxvig *et al*., 2007 ; Hansen *et al*., 2009 ; Christiansen *et al*., 2010 ; Echa, 2010) mais également chez la truite une induction de la maturation des ovocytes (Monod *et al*., 2004) et chez la caille

une réduction du nombre de spermatides (Gröte *et al*., 2008). Chez l'homme, l'application dermique ou l'absorption orale de l'époxiconazole révèle une métabolisation de la molécule (Oestreich *et al.,* 1997 ; Agritox, 2010) et l'absorption du fongicide est multipliée par un facteur quatre lorsque la formulation commerciale est utilisée (Aust *et al*., 2007).

Bien que les preuves restent à ce jour insuffisantes pour classer l'époxiconazole substance génotoxique (Agritox), une étude récente réalisée par Akcha *et al.* (2008) montre que l'époxiconazole (100 µg/L) produit des cassures des brins d'ADN chez le dinoflagellé *Karenia mikimotoi.* La toxicité de l'époxiconazole peut devenir importante vis-à-vis des organismes aquatiques lorsque ce fongicide est présent en même temps qu'un ou plusieurs autres pesticides (Stachowski-Haberkorn *et al*., 2009 , Nørgaard et Cedergreen, 2010).

La quantité de fongicide recommandée pour l'épandage par la société productrice BASF est de un litre de formulation commerciale Opus/ha, qui correspond donc à 125 g de substance active époxiconazole. Bien que l'EFSA (2008) dans son rapport scientifique indique que, après application, l'époxiconazole n'a que peu tendance à entrer dans l'atmosphère en raison de sa faible volatilisation à partir des plantes et du sol durant la pulvérisation, cette substance active a été retrouvée dans l'air ambiant de différents sites français (Coscollà *et al*., 2010), la fraction retrouvée étant comprise entre 0,12 et 3,99 ng/m^3. Dans le sol, l'époxiconazole est une molécule très persistante et un métabolite, le 1,2,4-triazole rapidement dégradé par les micro-organismes du sol, apparaît en infime quantité après 175 j (EFSA, 2008). Le temps de demi-vie de l'époxiconazole est estimé dans le sol à 20-69 j par Lin *et al.* (2001) et à plus de 400 j selon Bromilow *et al*. (1999), dans les marais à 65 j par Passeport *et al*. (2011) et, pour l'ensemble eau/sédiment, compris entre 68 et 172 j pour l'EFSA (2008). Sa dégradation est fonction du pH (Buerge *et al*. (2006) et des souches bactériennes présentes dans le sol (Lopes *et al*., 2009).

Bien que l'utilisation de l'époxiconazole n'est autorisée que comme molécule active dans les formulations des produits phytopharmaceutiques, la commission des communautés européennes recommande la réalisation de travaux supplémentaires afin de mieux

évaluer les effets néfastes de cette molécule sur l'environnement. D'autre part, en France l'époxiconazole a été classé dans la liste des molécules concernées par la redevance pour pollution diffuse établie par l'arrêté du 12 novembre 2009 et apparaît aussi sur la liste des produits dangereux retenus par la réduction d'usage pour 2015 dans les objectifs prévus par le Grenelle de l'environnement.

2. Chlorpyriphos-éthyl

2.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action

Le chlorpyriphos-éthyl (CAS n° 2921-88-2) ou O,O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, est un insecticide non systémique, à large spectre, commercialisé par Dow AgroSciences depuis 1965. Il appartient à la famille des organophosphorés et agit au niveau du système nerveux, en inhibant l'acétylcholine estérase qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur majeur (Doran *et al*., 2001 ; Tomlin, 2003 ; Barata *et* al., 2004 ; Buchwalter *et al*., 2004 ; Lukaszewicz-Hussain, 2010 ; Čolović *et al*., 2011). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Dursban 4® contenant 480 g/L de la molécule active.

Les seuls usages rapportés pour le chlorpyriphos sont liés à son action de pesticide (EPA, 2000) et il est appliqué directement sur le feuillage ou le sol pour le contrôle des parasites vivant dans le sol agricole ou urbain. Selon l'INERIS (2006), la consommation de chlorpyriphos aux USA est estimée à 9 000 - 10 000 tonnes par an (HC-SC, 1989 ; EPA, 2000) et les quantités produites mondialement seraient environ de 100 000 t/an.

2.2. Toxicité et devenir dans l'environnement

Après son application, le chlorpyriphos se retrouve à la fois dans les compartiments atmosphérique (Peck *et al*., 2005 ; Hageman *et al*., 2006 ; Yao *et al*., 2008 ; Zhou *et al*., 2010), aquatique (IFEN, 2002 ; Coupe et Blomquist, 2004) et dans les sols. Dans le sol, le chlorpyriphos se dégrade lentement, avec un temps de demi-vie estimé à 35 jours (Gouzy *et al*., 2005). Les pesticides organochlorés subissent une dégradation naturelle dans l'environnement, accentuée par la lumière et par la présence de métaux dissous, de substances humiques et de microorganismes (Dannenberg et Pehkonen, 1998 ; Pehkonen et Zhang, 2002 ; Kralj *et al*., 2007 ; Theriot et Grunden, 2011) et, le produit

d'oxydation du chlorpyrifos, le chlorpyrifos-oxon s'avère également être un puissant inhibiteur de l'acétylcholine estérase (Buchwalter *et al.,* 2004 ; Čolović *et al*., 2011).

L'utilisation extensive des insecticides organochlorés dont le chlorpyriphos se traduit par une pollution environnementale et les organismes non-cibles en sont devenus victimes, en raison d'une pénétration dans l'organisme par inhalation, absorption cutanée *via* le contact avec l'eau et par empoisonnement secondaire (alimentation) (Griffin *et al*., 1999 & 2000 ; Meuling *et al*., 2005 ; Farahat *et al*., 2010).

Chez les mammifères, ces insecticides inhibent non seulement l'acétylcholine estérase mais affectent également le système immunitaire, le pancréas, le foie, les systèmes hématologique et reproducteur (Thrasher *et al.,* 1993 ; Dam *et al*., 1998 & 1999 ; Gomes *et al*., 1999 ; Nandi *et al*., 2011). En outre, le chlorpyrifos est génotoxique (Muscarella *et al*., 1984 ; Jamil *et al*., 2004 ; Sandal et Yilmaz, 2011) et il induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène, générant un stress oxydatif dans différents tissus (Verma *et al*., 2007 ; Mehta *et al*., 2009 ; Lukaszewicz-Hussain, 2010 ; Demir *et al.,* 2011 ; Foxenberg *et al*., 2011).

Les organismes aquatiques se révèlent particulièrement sensibles à l'action du chlorpyrifos. De nombreux travaux ont montré la toxicité de cet insecticide vis-à-vis du zooplancton dulçaquicole, (Hurlbert *et al*., 1972 ; Papst et Boyer, 1980 ; Brock *et al*., 1992 ; Van Wijngaarden *et al*., 1996 & 2005 ; Van den Brink *et al*., 1995 & 1996 ; Bailey *et al*., 1997 ; Woods *et al*., 2002 ; Fleeger *et al*., 2003 ; Pablo *et al*., 2008 ; López-Mancisidor *et al*., 2008 ; Pablo *et al*., 2008) ou d'eau salée (Simon *et al*., 1995 ; Colville *et al*., 2008), avec dans la plupart des cas une augmentation de la population phytoplanctonique : ces effets engendrent donc une modification de la structure des communautés. La toxicité du chlorpyrifos a également été rapportée pour des poissons tels que *Aphanius fasciatus* (Boumaiza *et al.,* 1979), *Tilapia Guineensis* (Chinah *et al.,* 2004), *Oreochomis niloticus* (Gul, 2005 ; Oruç, 2010), avec une perturbation du métabolisme de différents organes montrée chez *Heteropneustes fossilis* (Tripathi et Shasmal, 2011). En outre, dans un travail récent, Oruç (2010) met en évidence, que le chlorpyrifos, outre un stress oxydatif, agit comme un perturbateur endocrinien chez *Oreochomis niloticus* et tératogène chez *XenOpus laevis* (Bonfanti *et al*., 2004).

3. Nonylphénol

3.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action

Le nonylphenol (NP), est un composé organique synthétique, appartenant à la famille des alkylphénols. Le terme nonylphénol (CAS 25154-52-13) recouvre un grand nombre d'isomères différents, de formule $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$, dont certains ont reçu des numéros CAS spécifiques comme le 4-nonylphénol ramifié (CAS 84852-15-3). Les principales impuretés présentes dans cette molécule sont le 2-nonylphénol et le 2,4-dinonylphénol.

Le nonylphénol est utilisé comme intermédiaire dans la production de nonylphénol éthoxylates (NPEs), sous-groupe d'une classe plus large de composés chimiques identifiés comme étant les alkylphénol éthoxylates (APEs). Les NPEs, grand groupe de surfactants non ioniques, sont largement employés dans l'industrie des plastiques, des détergents ménagers et industriels, des peintures et comme stabilisant dans l'industrie des polymères (Lee, 1999 ; Vasquez-Duhalt *et al*., 2005). Le nonylphénol est également utilisé comme substance active, adjuvant ou co-formulant dans des produits phytopharmaceutiques (pesticides et biocides) et des médicaments vétérinaires.

La production de nonylphénols dans l'Union européenne était, en 1997, de 73 500 tonnes (JRC, 2002). La directive 2003/53/CE (18 juin 2003) a interdit leur utilisation dans les pesticides à partir du début 2005 mais, en France, les autorisations de pesticides restent valables 10 ans et cette interdiction ne prendra donc effet qu'à compter de 2015.

3.2. Toxicité et devenir dans l'environnement

Il a été estimé que 300 000 tonnes d'alkylphénols sont produites par an et que 60 % sont rejetés dans l'environnement aquatique, soit directement à partir des effluents non traités soit indirectement à partir des usines de traitements des déchets (Ekelund *et al*., 1993 ; Maguire, 1999 ; Nice *et al*., 2000 ; Cakal Arslan et Parlak, 2007). Dans les écosystèmes aquatiques, les APEs sont dégradés par les microorganismes et le métabolite majeur produit est le nonylphénol, plus toxique que ses composés parents (Ekelund *et al*., 1990 ; Naylor *et al*., 1992 ; Vazquez-Duhalt *et al*., 2005). En raison de l'utilisation intensive des APEs, les nonyphénols ont été détectés dans les rivières, les

lacs et les eaux côtières (Ying *et al*., 2002). Des concentrations variées ont été mesurées dans les eaux de différents pays pouvant atteindre quelques centaines de µg/L (Ekelund *et al*., 1990 ; Naylor *et al*., 1992 ; Ahel *et al*., 1994 ; Blackburn et Waldock, 1995 ; Bennie, 1999 ; Rice *et al*., 2003 ; Vazquez-Duhalt *et al*., 2005 ; Li *et al*., 2008 ; Tomanek *et al*., 2010). Composé hydrophobe, le nonylphénol est rapidement adsorbé sur les sédiments et sa concentration peut s'élever à 13 700 µg/Kg (Vazquez-Duhalt *et al*., 2005). Dans l'air, alors que le nonylphénol est théoriquement semi-volatil (tension de vapeur de $2{,}07 \times 10^{-2}$ Pa et une constante de Henry de $8{,}39 \times 10^{-9}$ Pa m^3/mol), l'échange eau-air s'avère possible. La présence de nonylphénol a, en effet, été mise en évidence dans l'atmosphère à une concentration de l'ordre de 70 – 81 ng/m^3 (Dachs *et al*., 1999 ; Van Ry *et al*., 2000).

Dans l'environnement, bien qu'il puisse être dégradé en conditions hautement oxygénées et par certains microorganismes, le nonylphénol est relativement persistent (Ekelund *et al*., 1993 ; Vallini *et al*., 2001 ; Vazquez-Duhalt *et al*., 2005 ; Bradley *et al*., 2008 ; Liu *et al*., 2010). Lipophile, ce composé a été montré s'accumuler dans une grande variété d'organismes marins et d'eau douce incluant les algues, les crustacés, les mollusques et les poissons (Ekelund *et al*., 1990 ; Granmo *et al*., 1991 ; Ahel *et al*., 1993 ; Servos, 1999 ; Corsi et Focardi, 2002 ; Rice *et al*., 2003 ; Correa-Reyes *et al*., 2007 ; Ricciardi *et al*., 2008 ; Riva *et al*., 2010 ; Spehar *et al*., 2010 ; Liu *et al*., 2011). Quelques études ont montré qu'une partie du nonylphénol accumulé dans les organismes est partiellement dégradée chez *Navicula incerta* (Liu *et al*., 2010) mais aussi conjuguée à un acide glucuronique chez la truite-arc-en-ciel (Vazquez-Duhalt *et al*., 2005).

De nombreux travaux ont souligné la toxicité aiguë et chronique de ce composé vis-à-vis de poissons et crustacés (Granmo *et al*., 1989 & 1991 ; Lussier *et al*., 2000 ; Nice *et al*., 2000 ; Matozzo *et al*., 2003 ; Zhang *et al*., 2003 ; Dwyer *et al*., 2005 ; Milam *et al*., 2005 ; TenEyck et Markee, 2005 ; Vazquez-Duhalt *et al*., 2005 ; Quinn *et al*., 2006 ; Cakal Arlan et Park, 2007 ; Hong et Li, 2007 ; Beklioglu *et al*., 2010 ; Liu *et al*., 2011) mais également vis-à-vis des microalgues (Servos, 1999 ; Correa-Reyes *et al*., 2007 ; Liu *et al*., 2010 ; Gao et Tam, 2011). Le retard de croissance et la faible survie observés pour plusieurs organismes entraînent une perturbation des écosystèmes (Liber *et al*., 1999 ; Vazquez-Duhalt *et al*., 2005). De nombreuses études ont montré que les crustacés d'eau

douce étaient en général plus sensibles à l'action du nonylphénol comparativement à d'autres organismes tels les poissons *Pimephales promelas* (TenEyck et Markee, 2005), la truite arc-en-ciel (Spehar *et al*., 2010) ou encore la moule *Lampsilis cardium* (Milam *et al*., 2005). De la même façon, en milieu marin, la crevette (*Crangon crangon*) s'avère plus sensible que la moule (*Mytilus edulis*) à la toxicité du nonylphénol (Granmo *et al*., 1991).

En revanche, comparant la sensibilité de différents animaux marins, Lussier *et al.* (2000) montrent que ce sont les larves du poisson *Pleuronectes americanus* qui présentent la plus grande sensibilité, indiquant ainsi l'importance du stade de développement. Cette influence du stade de développement a été montrée par Tabata *et al*. (2001) pour le poisson *Oryzias lapites* : les juvéniles (LC_{50} : 130 µg/L) s'avérant nettement plus sensibles au nonyphénol que les adultes (LC_{50} : 860 µg/L).

Le nonylphénol produit une inhibition de la croissance, des anomalies morphologiques et la létalité. En outre, de nombreuses études ont montré que le nonylphénol possède une activité œstrogénique et cause une perturbation endocrinienne à la fois chez l'homme et chez d'autres animaux. Chez les poissons, cet effet a été démontré dans de nombreux travaux (revus par Vazquez-Duhalt *et al*., 2005). Chez les invertébrés, quelques études ont montré que le nonylphénol peut influencer le développement des organes sexuels du cladocère *Daphnia magna* (Baldwin *et al*., 1997), de la moule *Dreissena polymorpha* (Riva *et al*., 2010) ou encore de l'huître *Crassostrea gigas* (Nice *et al*., 2003) et augmenter la fertilité de l'amphipode *Corophium volutator* (Brown *et al*., 1999). Si les organismes aquatiques constituent des cibles privilégiées du nonylphénol, son utilisation extensive fait qu'il peut représenter un risque de santé publique. Outre le fait d'être un perturbateur endocrinien, le nonylphénol induit la mort des cellules souches par activation de la cascade des caspases (Kudo *et al*., 2004 ; Kuo *et al*., 2010) et peut favoriser le cancer du sein et des poumons (Seike *et al*., 2003 ; Vivacqua *et al*., 2003).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

En application des recommandations préconisées par le TGD dans son volet portant sur le milieu marin, l'évaluation de la toxicité des contaminants chimiques a été abordée sur quatre des six niveaux trophiques recommandés par le TGD à savoir : phytoplancton, échinoderme, mollusques et poisson. Le phytoplancton a été traité au travers de trois espèces de microalgues cultivées dans des conditions similaires à celles rencontrées dans le golfe de Gabès et le protocole suivi est celui de la norme AFNOR NF ISO 10253 (2004). Par ailleurs, une étude a été menée en microcosmes sur des communautés phytoplanctoniques naturelles du golfe de Gabès. Les essais sur échinoderme, mollusques et poisson ont été réalisés sur des espèces présentes le long des côtes tunisiennes ; les protocoles suivis correspondent à des normes nationales (AFNOR –NF T90 XP-283, 2009 ; SPE 1/RM/27) pour les bivalves et l'oursin ou aux recommandations des lignes directives de l'OCDE voire OSPAR (Mhadhbi *et* al., 2010).

De nouveaux protocoles ont été également employés ou développés afin d'obtenir des informations de toxicité directe ou par empoisonnement secondaire des contaminants vis-à-vis des espèces étudiées (Beiras et His, 1994 ; His *et al.*, 1997, 1999).

I. Préparation des substances testées

1. L'eau de mer de référence

L'eau de mer de référence sert à la réalisation des témoins et à la préparation des dilutions des milieux à tester, la connaissance de sa qualité est essentielle pour assurer la validité des tests et de leurs résultats. La qualité de l'eau de mer utilisée doit être compatible avec un bon développement de l'espèce test employée (Quiniou *et al.*, 1997 ; His *et al.*, 1999 - *in* Quiniou *et al.*, 2005)

L'eau utilisée dans les bio-essais (phytoplancton et huître) réalisés à Brest (France) provient de l'écloserie d'Ifremer d'Argenton (Finistère), alors que celle utilisée dans les bio-essais (oursin, palourde et poisson) réalisés à Vigo (Espagne) provient de l'écloserie de la station biologique de l'île de Toralla (Galice). Ce sont des eaux dont la qualité surveillée et suivie, permet les cultures et élevages dans ces écloseries. A chaque prélèvement, l'eau a été préfiltrée sur une membrane de porosité de 1 µm et traitée aux ultra-violets. Juste avant emploi, elle est filtrée sur une membrane de type Millipore HVLP de porosité 0,2 µm. Cette filtration permet d'éliminer la totalité des particules en suspension ainsi que la majorité des microorganismes, ne laissant que les éléments dissous.

Après prélèvelment et pré-filtration, l'eau est conservée à 15 °C et à l'obscurité.
Pour les tests réalisés sur le phytoplancton, l'eau de mer de référence pré-filtrée, est vieillie trois à quatre semaines (en bidons en plastique de qualité alimentaire) afin de laisser cultiver les microorganismes qui vont consommer les sels nutritifs présents dans l'eau. Juste avant emploi, elle est filtrée sur membrane de porosité 0,2 µm puis autoclavée.

Pour les autres tests (oursin et bivalves), elle est employée dans les 15 jours suivant sa collecte.

2. Les contaminants

2.1. Le toxique de référence

Les tests utilisant le cuivre comme toxique de référence, ont été préparés à partir de $CuSO_4$ (Sigma-Aldrich), ajouté aux milieux de culture à des concentrations finales variant de 1 à 9 720 µg/L de $CuSO_4$-$5H_2O$ correspondant à des teneurs de 0,40 à 3 810 µg/L d'ion cuivre.

2.2. Les substances et formulations testées

Trois contaminants chimiques ont été testés : le nonylphénol (Figure 3), l'époxiconazole (Figure 4) et sa formulation commerciale Opus® et le chlorpyrifos-éthyl (Figure 5) en formulation Dursban®.

La solution de nonylphénol (Sigma-Aldrich) est réalisée par dissolution de 15 µL de solution de nonylphénol (CAS 25154-52-13) dans quatre litres d'eau de mer, placée en agitation pendant 48 h, en raison de la faible solubilité de ce composé. Après stérilisation par filtration (filtres Dynagard, 0,2 µm), des dilutions sont effectuées pour les tests de toxicité. Un dosage de la concentration effective a été effectué par IDHESA (Brest).

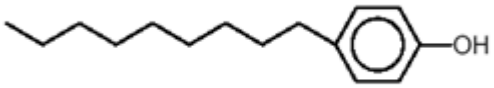


Figure 3 : *Structure chimique du nonylphénol*

L'époxiconazole (CAS nº 133855-98-8), (M.M. 329,8) dont la structure chimique est montrée ci-dessous a été testé sous sa formulation commerciale Opus (BASF, France).
La solution stock d'Opus a été réalisée à partir de l'émulsion commercialisée comportant 125 g/L d'époxiconazole. Une solution à 10 mg d'époxiconazole/L obtenue après dilution est stérilisée par filtration (filtres Dynagard, 0,2 µm).

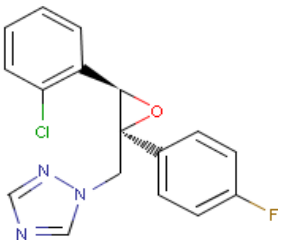


Figure 4 : *Structure chimique de l'époxiconazole*

La solution stock de la molécule pure d'époxiconazole (Dr Ehrenstorfer GmbH) a été préparée par dissolution de l'époxiconazole dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Pour chaque test des témoins positifs en présence de DMSO ont été réalisés pour déterminer l'effet du solvant.

La concentration nominale des solutions stocks contenant l'époxiconazole a été contrôlée par le laboratoire IDHESA (Brest, France) en utilisant une extraction en phase solide en ligne couplée à une chromatographie liquide et un spectromètre de masse à ionisation tandem (Waters 2690 module de séparation HPLC, Waters 996 détecteur à

barrette photodiode; Micromass Quattro Ultima). La limite de détection était de 0,005 µg/L.

Le chlorpyriphos-éthyl (CAS n° 2921-88-2) a été utilisé sous sa formulation commerciale Dursban 4® (480 g/L) (Dow AgroSciences).

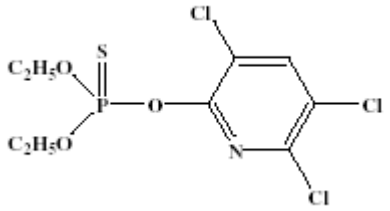


Figure 5 : *Structure chimique du chlorpyriphos-éthyl*

La solution stock de 100 mg/L a été préparée par dissolution de 83 µL de solution Dursban 4® dans 400 mL d'eau de mer et agitation pendant 48 h.

Dans le milieu naturel, les organismes ne sont généralement pas exposés à une seule molécule, mais à des mélanges complexes de substances de plusieurs types, ce qui peut générer des effets additifs, antagonistes ou synergiques. Ces mélanges sont susceptibles d'abaisser les seuils de toxicité des molécules testées, rendant primordial l'évaluation des effets provoqués par les mélanges.

II. Les bio-essais sur le phytoplancton

L'évaluation de l'effet des contaminants sur le phytoplancton a été réalisée :

- d'une part à l'aide de bio-essais mono-spécifiques suivant le protocole de la norme AFNOR 10 253 (2004) en utilisant un milieu riche (f/2) et un milieu reproduisant des conditions de culture (composition des milieux en nutriments et éclairement) proches de celles rencontrées en milieu naturel dans le littoral tunisien et,
- d'autre part par l'étude de l'évolution de la composition spécifique des communautés phytoplanctoniques naturelles du golfe de Gabès cultivées dans les conditions d'enrichissement naturel de l'eau de mer du golfe de Gabès.

1. Tests micro-algues

1.1. Espèces bio-indicatrices

Les expériences ont été réalisées avec trois espèces de microalgues marines : *Chaetoceros calcitrans, Isochrysis affinis galbana, Tetraselmis suecica*.

Les souches utilisées sont cultivées en routine au laboratoire et leurs origines n'ont pas été identifiées. Toutefois, les réponses aux toxiques de référence testés ont permis de les comparer aux souches recommandées par la norme standard ISO 10253 (AFNOR, 2004).

1.1.1. *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano

Chaetoceros calcitrans (Figure 6) est une algue unicellulaire pélagique de la classe des diatomées (*Bacillariophyceae*), ordre des Biddulphiales et famille des *Chaetocerotaceae*.

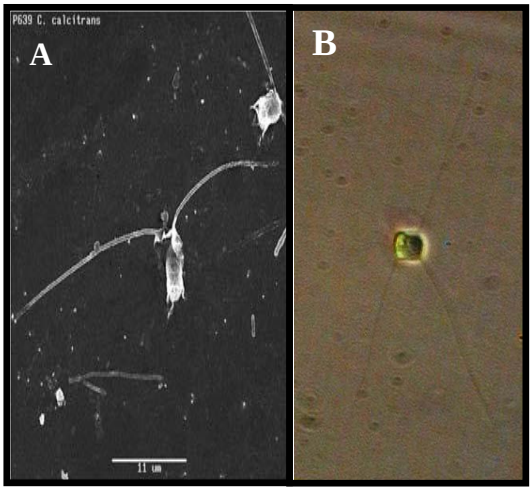


Figure 6 : *Cellules de Chaetoceros calcitrans.*
***A** : Microscope électronique ; **B** : Microscope optique (Robert et al., 2004).*

Vivant dans les eaux côtières et estuariennes, les cellules ont une forme carrée ou plus ou moins rectangulaire, de 5 à 10 µm selon l'allongement de la ceinture, les soies sont bien visibles et insérées de 15 à 35 ° par rapport à l'axe pervalvaire. *C. calcitrans* présente une coque siliceuse (la frustule). Elle possède une activité photosynthétique importante et un taux de division élevé ; pour cela elle puise dans le milieu une quantité importante de sels nutritifs. Cette microalgue, très riche en cholestérol, est souvent utilisée comme algue fourrage dans les écloseries (Robert et His, 1985a ; Delaunay *et al*., 1993).

1.1.2. *Isochrysis affinis galbana*

Isochrysis affinis galbana (clone *T-iso*) (Figure 7) est une algue flagellée de la classe des Prymnésiophytes, ordre des Isochrysidales et famille des Isochrydacées. La taille des cellules est généralement comprise entre 4 et 6 µm et le volume cellulaire est de l'ordre de 40 μm^3 (Chrétiennot-Dinet, 1990). Cette espèce, a été isolée à Tahiti, d'où le nom de *T-iso* pour « Tahiti-*Isochrysis* » qui correspondrait à une forme physiologique d'*Isochrysis galbana*, très répandue dans le milieu aquatique. Cette dernière est, depuis une vingtaine d'années, remplacée en aquaculture en grande partie par la forme *T-iso*, adaptée aux eaux chaudes et plus résistante aux fortes températures (30 °C).

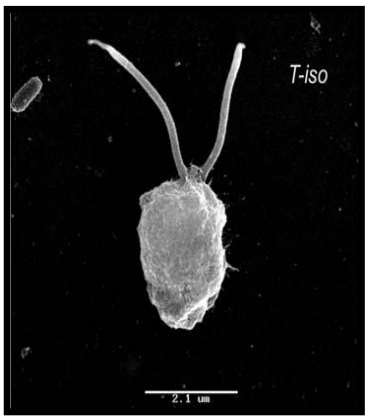


Figure 7 : *Photographie au microscope électronique d'Isochrysis affinis galbana (Robert et al., 2004).*

Le genre est décrit par une cellule mobile solitaire, de forme ovoïde, possédant deux flagelles sub-égaux, lisses, à insertion apicale ou sub-apicale et un haptonème réduit dit vestigial. La cellule est habituellement recouverte de minuscules écailles organiques (0,2 à 0,4 µm). La relative grande proportion de caroténoïdes, principalement des xanthophylles (fucoxanthine et diadinoxanthine), confère à la cellule une couleur brune parfois jaune (Philips Dales, 1960). Il est possible d'observer un plaste généralement jaune d'or à pyrénoïde immergé. La reproduction est végétative dans les stades non mobiles ou mobiles. L'autre caractéristique la différenciant des autres flagellés est sa nage oscillante particulière qui la fait tourner sur elle-même : son déplacement se fait à la vitesse de quelques dizaines de micromètres par seconde et n'est pas uniquement rectiligne (brusques changements de direction observés).

1.1.3. *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis suecica (Figure 8) est une algue flagellée de la classe des *Chlorophyceae*, ordre des Volvocales et famille des *Chlamydomonadaceae*. La taille de la cellule est généralement comprise entre 9 et 11 µm. Cette espèce d'algue, caractérisée par sa couleur verte et sa forme ovoïde, possède quatre flagelles, aussi longs ou légèrement plus courts que la cellule. Le chloroplaste unique, profondément lobé avec deux ou quatre lobes, présente un pyrénoïde sub-basal et un stigma postérieur. Grâce à sa taille importante, sa forme et la nage des cellules, *Tetraselmis* est facilement reconnaissable au microscope optique.



Figure 8 : *Photographie au microscope optique de Tetraselmis suecica. (Source : starcentral.mbl.edu)*

1.2. Composition des milieux de culture et protocoles expérimentaux des tests

Quelques travaux antérieurs font état de l'effet des conditions de culture sur la sensibilité des microalgues vis-à-vis des contaminants chimiques (Sbrilli *et al*. 2003, Shun-Xing *et al*. 2007 ; Arzul *et al*. 2008 ; Hourmant *et al*. 2009). L'utilisation d'un milieu de culture reproduisant les conditions rencontrées en milieu naturel reste une méthode très rarement utilisée dans les études écotoxicologiques réalisées sur le phytoplancton marin.

Dans ce travail les cultures de microalgues ont été réalisées en utilisant deux types de milieux : le milieu riche de Gabès G+ et le milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962). Les données recueillies sur le Golfe de Gabès permettent de connaître l'évolution mensuelle

de la composition moyenne en sels nutritifs de l'eau de mer (Figure 9) (Hamza, Sfax, communication personnelle). A partir de ces données tunisiennes, un milieu de culture a pu être défini pour les microalgues à étudier pour savoir si les conditions naturelles du Golfe de Gabès pouvaient modifier ou pas les effets de toxicité et/ou la résistance des micro-algues. Ce milieu correspond à un enrichissement maximal de l'eau de mer en sels nutritifs dans le golfe de Gabès à la fin de l'automne - début de l'hiver, il a été dénommé G+.

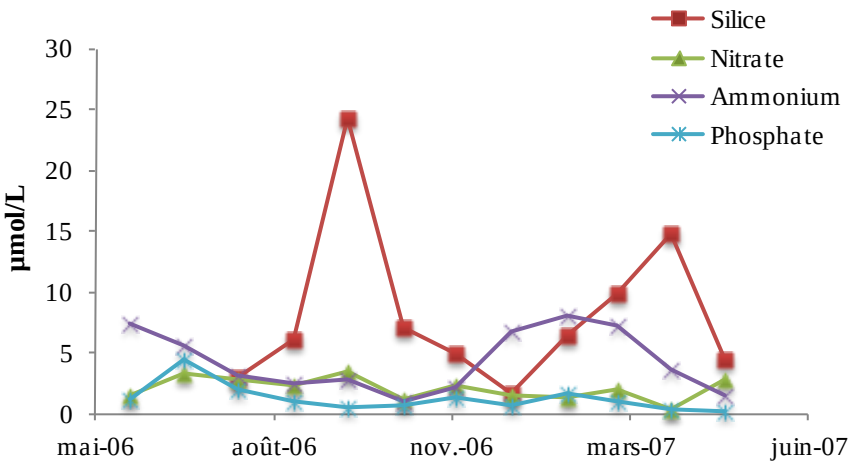


Figure 9 : *Variations mensuelles des concentrations en sels nutritifs dans le golfe de Gabès*

Pour les deux milieux, l'eau de mer, provenant de l'écloserie d'Argenton (Ifremer), de salinité 35 a été enrichie stérilement en $NaNO_3$ et NaH_2PO_4, après autoclavage, aux concentrations données dans le tableau 4. Sont ensuite ajoutés aux deux milieux, de la silice (Na_2SiO_3 : 54 à 107 µM), des vitamines, des éléments traces métalliques et le mélange : éthylène diamine tétracétate disodique + chlorure ferrique (Fe-EDTA) selon Guillard et Ryther (1962).

Tableau 4 : Composition des milieux de culture.

Composition	Milieu G+	Milieu f/2
Eléments majeurs (µmol/L)		
$NaNO_3$	8,9	880
NaH_2PO_4, H_2O	4,4	36,6
Na_2SiO_3, $9H_2O$	54 à 107	54 à 107
Traces métalliques (µmol/L)		
$CuSO_4$, $5H_2O$	0,04	0,04
$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,08	0,08
$CoCl_2$, $6H_2O$	0,05	0,05
$MnCl_2$, $4H_2O$	0,9	0,9
Na_2MoO_4, $2H_2O$	0,03	0,03
Fe-EDTA (en µmol/L)		
$FeCl_3$, $6H_2O$	11,7	11,7
Na_2-EDTA	11,7	11,7
Solution de vitamines (moles/L)		
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	1×10^{-10}	1×10^{-10}
Biotine	2×10^{-9}	2×10^{-9}
Thiamine	3×10^{-7}	3×10^{-7}

1.2.1. Préparation des cultures

Les cultures-mères de 500 mL sont réalisées dans des ballons stériles de un litre permettant ainsi d'optimiser la surface des échanges gazeux. Le milieu de culture (G+ ou f/2) est ensemencé de façon à obtenir une densité cellulaire d'environ 10 000 cellules/mL. Cette culture-mère doit être repiquée tous les 3-4 jours.

Les effets des contaminants sont étudiés dans des ballons stériles de 250 mL, contenant 100 mL de milieu, ensemencés avec un inoculum de culture-mère âgée de 3-4 j, permettant l'obtention d'une densité cellulaire de 10 000 cellules/mL.

Pour chaque contaminant, des essais préliminaires sont effectués pour déterminer la gamme de concentrations permettant de définir au mieux son action sur les paramètres de croissance. Les concentrations sont alors choisies de façon à obtenir plusieurs niveaux d'inhibition de la croissance variant d'environ 10 % à plus de 90 %.

Les cultures sont conduites à 20 ± 1 °C, en lumière continue ou avec une photopériode de 16 h, avec 60 µmol / m^2 /sec de radiations photosynthétiquement actives (PAR), contrôlées à l'aide d'un quantamètre (Li-Cor, model Li 250 light Meter).

1.3. Etude physiologique et dosages biochimiques

L'évaluation du comportement du phytoplancton vis-à-vis des contaminants du milieu repose sur l'étude de la réponse physiologique des microalgues. Afin de mieux comprendre l'effet des substances testées, quelques paramètres physiologiques ont été suivis au cours des bio-essais.

1.3.1. Suivi de la croissance

La densité cellulaire dans le milieu est mesurée quotidiennement sur trois parties aliquotes. Après fixation des cellules au lugol, le comptage est effectué au microscope, à l'aide d'une cellule de Malassez pour les trois algues étudiées (*C. calcitrans, I. galbana, T. suecica*). Les taux de croissance (µ) et d'inhibition (Iµi) ainsi que la CE_{50} (Concentration Effective produisant 50 % d'inhibition du taux de croissance) sont calculés après 72 h de culture selon la méthode préconisée pour le phytoplancton marin par la norme ISO 10253 (AFNOR, 2004).

$\mu = (\ln N_f - \ln N_0)/t_f$

Avec **N_f :** concentration cellulaire finale.

N_0 : concentration cellulaire initiale.

t_f : temps en heures entre l'ensemencement et la dernière mesure.

$I\mu i = [(\mu c - \mu i) \times 100]/\mu c$

Avec **Iµi :** pourcentage d'inhibition pour la concentration d'essai i.

µc : taux de croissance de la culture témoin.

µi : taux de croissance pour la concentration d'essai i.

1.3.2. Détermination des seuils de toxicité (CSEO, CE_{50})

Les valeurs de CE_{50} et CSEO sont calculées au moyen du logiciel REGtox® (Vindimian *et al.*, 1983) qui fonctionne en tant que macro à partir d'une feuille Excel. Ce logiciel est basé sur des modèles logistiques pour établir une courbe-dose (taux de croissance μ en fonction de la concentration du contaminant). Dans le cadre de ces bio-essais, la courbe effet-dose a été réalisée selon l'équation de Hill (Vindimian *et al.,* 1983) décrite pour modéliser la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine. Cette équation s'est révélée pertinente pour d'autres applications en biologie, notamment en ce qui concerne les courbes dose-réponse en toxicologie et écotoxicologie (Vindimian *et al.*, 1983 ; Garric *et al.*, 1990). L'équation de Hill caractérise la pente de la relation dose-réponse au point d'inflexion et la CE_{50} la dose d'effet médian.

1.3.3. Mesure du volume cellulaire

Les cellules algales, préalablement fixées au lugol, ont été fixées par de la poly-lysine sur une lamelle en verre. L'observation des cellules a été réalisée au microscope inversé Zeiss Axiovert 135 et les volumes cellulaires ont été estimés à l'aide du logiciel Visilog software (version 6).

1.3.4. Extraction et dosage des pigments

Des volumes de 200 à 500 mL de suspension algale sont filtrés (Millipore, HVLP 0,45 μm) et l'extraction des pigments est réalisée dans des fioles à scintillation liquide avec 3 mL de méthanol. Après passage au vortex, les fioles bouchées sont placées au bain-marie à 65 °C pendant 20 min et les filtres sont alors retirés. Une centrifugation de 15 min est effectuée à 5 000 tours/min et les absorbances (A) du surnageant sont mesurées aux longueurs d'ondes de 480, 510, 630 et 664 nm (spectrophotomètre Shimadzu UV-1605). Les teneurs en pigments de *C. calcitrans* et de *I. galbana* données par les équations de Jeffrey et Humphrey (1975) et de Gala et Giesy (1993) en μg /mL et sont ensuite exprimées en ng /million de cellules.

$$\text{Chlorophylle a} = 11{,}47\ A_{664} - 0{,}4\ A_{630}$$

$$\text{Chlorophylle c} = 24{,}36\ A_{630} - 3{,}73\ A_{664}$$

$$\text{Caroténoïdes} = 7{,}6\ (A_{480} - 1{,}49\ A_{510})$$

Pour *T. suecica*, qui contient de la chlorophylle b, l'extraction est faite selon la même méthode mais les absorbances (A) du surnageant sont mesurées aux longueurs d'ondes de 470, 652 et 665 nm. Les teneurs en pigments données par les équations de Wellburn (1994) en µg / mL, sont ensuite exprimées en ng /million de cellules.

Chlorophylle a = 16,72 A_{665} - 9,16 A_{652}

Chlorophylle = 34,09 A_{652} - 15,28 A_{665}

Caroténoïdes = 4,53 A_{470} - 16 A_{652} + 7,13 A_{665}

1.3.5. Mesure de la photosynthèse et de la respiration.

Afin de mesurer ces deux paramètres, une électrode à oxygène de type Clark (YSI 53 Oxygen Monitor) est plongée dans de l'eau de mer saturée en air, à 20°C. La teneur en O_2 dans le milieu, pour une salinité de 34, est de 7,43 mg d'O_2 /L (Strickland et Parsons, 1972).

Les mesures des échanges gazeux sont effectuées par utilisation de 5 mL de suspension algale maintenue en agitation. La photosynthèse apparente est déterminée par l'augmentation de la teneur en O_2 dans le milieu, pour une PAR (Photosynthetically Active Radiations) de 100 µmol/m^2/s (Li-Cor, model Li 250 light Meter). A l'obscurité, la respiration est mesurée par la diminution de la teneur en O_2 dans le milieu.

1.3.6. Mesure par fluorescence de l'efficacité photochimique

La mesure des rendements de fluorescence a été réalisée grâce au fluorimètre LuminoTox Analyseur (Lab-Bell Inc.), biocapteur permettant de déterminer rapidement un indice de contamination chimique (ICC) de l'eau. Cet indice est évalué par la mesure de l'inhibition de la fluorescence et donc de l'activité photosynthétique de systèmes biologiques. Les mesures, qui peuvent être réalisées à partir de Systèmes Aquatiques Photosynthétiques Stabilisés (SAPS) ou de Complexes Enzymatiques Photosynthétiques (CEP) extraits de feuilles de plantes supérieures, ont été effectuées dans le cadre de ce travail sur des cellules intactes.

Après 10 min à l'obscurité, la suspension algale a été soumise à une lumière d'excitation de 470 nm, produite par trois LEDS. Pour la détection de la fluorescence, une photodiode protégée par un filtre HB700 (5 % de transmittance à 680 nm, 25 % à 690 nm et 50 % à 700 nm) est utilisée. Deux niveaux de rendement de fluorescence du photosystème II : F_1 et F_2 sont déterminés (Bellemare *et al*., 2001) selon la séquence suivante : **1)** après déclenchement d'une lumière de faible intensité (20 µmol photons/m^2 /sec) pendant 2 sec, donnant le rendement de fluorescence F_1 ; cette valeur de fluorescence ne varie pas chez les témoins ; **2)** puis après exposition de la suspension pendant 0,7 sec à un éclair de 500 µmol photons/m^2/sec, engendrant la saturation des centres photosynthétiques et l'émission de fluorescence maximale. Le programme intégré dans l'appareil réalise, à partir des valeurs de F_1 et F_2, le calcul de l'efficacité photochimique et du pourcentage d'inhibition selon les équations suivantes :

L'efficacité photochimique de la suspension algale témoin est calculée à partir du rapport :

Efficacité $_{\text{témoin}}$ = ($F_{2\ \text{témoin}}$ - $F_{1\ \text{témoin}}$) / $F_{2\ \text{témoin}}$

L'efficacité photochimique des suspensions algales traitées aux toxiques est calculée à partir du rapport :

Efficacité $_{\text{échantillon}}$ = ($F_{2\ \text{échantillon}}$ - $F_{1\ \text{échantillon}}$) / $F_{2\ \text{Témoin}}$

Pourcentage d'inhibition de l'efficacité photochimique**: [(Eff $_{\text{Témoin}}$-Eff $_{\text{Ech}}$) / Eff $_{\text{Témoin}}$] x 100**

1.3.7. Dosage de l'ATP

L'ATP est utilisé comme source d'énergie dans les réactions chimiques des cellules, c'est un indicateur de l'état de santé des cellules et de leur activité physiologique. Le dosage de l'ATP est basé sur la mesure de l'émission lumineuse en présence du mélange enzymatique luciférine-luciférase selon la réaction suivante :

$$\text{ATP} + \text{luciférine} + O_2 \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{Luciférase}} \text{Oxyluciférine} + \text{AMP} + \text{PPi} + CO_2 + \text{photons}$$

La lumière émise est proportionnelle à la concentration en ATP et la teneur des cellules en ATP est déterminée par standardisation.

L'extraction et le dosage de l'ATP sont réalisés à l'aide de microplaques de 96 puits et de kits ATPlite comportant un tampon de lyse et le mélange luciférine-luciférase, l'ensemble étant commercialisé par Perkin Elmer®.

A 100 µl de la culture algale déposés dans un puits sont ajoutés 50 µL de tampon de lyse. La plaque est alors recouverte d'un film collant en plastique et placée en agitation douce pendant 5 min. 50 µl du mélange luciférine-luciférase sont ensuite ajoutés dans chaque puits et à nouveau, l'ensemble est soumis à une agitation de 5 min. Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité, la mesure de la bioluminescence est effectuée (10 sec), à l'aide d'un luminomètre Victor (Perkin Elmer®).

La standardisation est réalisée en utilisant une gamme de concentrations en ATP variant de une à dix pmoles / 100 µl et qui subissent les mêmes étapes de préparation que les échantillons.

2. Tests sur les communautés naturelles de phytoplancton

2.1. Origine des communautés phytoplanctoniques testées

L'étude de l'effet de deux pesticides le chlorpyrifos-éthyl (Dursban) et l'époxiconazole (Opus), testés seuls et en mélange et, d'un adjuvant, le nonylphénol, a été réalisée en microcosmes sur les populations naturelles de phytoplancton du golfe de Gabès et plus précisément de la lagune de Boughrara pendant une période de bloom du dinoflagellé *Karenia selliformis*, en décembre 2008.

La lagune de Boughrara est située dans le Sud-Est tunisien entre les méridiens 10°45' et 10°57' est et les parallèles 33°28' et 33°45' Nord (Figure 10). C'est une sorte de mer intérieure bordée par l'île de Jerba du côté nord et par le continent du côté sud. Son bassin versant, dont la superficie est de 2 394 km^2, est drainé par six principaux oueds qui se déversent dans la lagune. Elle couvre une superficie de 50 000 hectares, présente une profondeur moyenne de l'ordre de 5 m et est entourée de cinq sebkhats qui correspondent à des dépressions planes, inondables et dont les sols salés interdisent

toute végétation sur la plus grande partie de leur surface (Benrejeb-Jenhani et Romdhane, 2002). Elle est le siège d'une importante activité aquacole, le système de production adopté est du type grossissement intensif dans des bassins en béton. Ce plan d'eau communique avec la mer par le canal Ajim-Jorf, large de 2,2 km et par une petite ouverture de 12 m de largeur, située sous le pont de la chaussée romaine dans le bassin d'El Kantara. Cette lagune est sujette à des phénomènes de marée dont la valeur maximale de marnage, 80 cm en période de vives eaux, est enregistrée au niveau du port d'Ajim. La construction de la chaussée romaine et l'ensablement actuel de la baie d'El Kantara, sont responsables de la réduction des échanges mer-lagune (Benrejeb-Jenhani et Romdhane, 2002). En effet, l'analyse, par modélisation du fonctionnement hydrodynamique de la lagune, a montré que les échanges à travers le canal sont très faibles, de l'ordre de 0,4 %, que la stagnation des eaux au niveau des zones nord et sud ouest est inévitable et que le vent reste le seul facteur d'activation de la circulation interne et d'homogénéisation des eaux de la lagune (Anonyme, 2000).

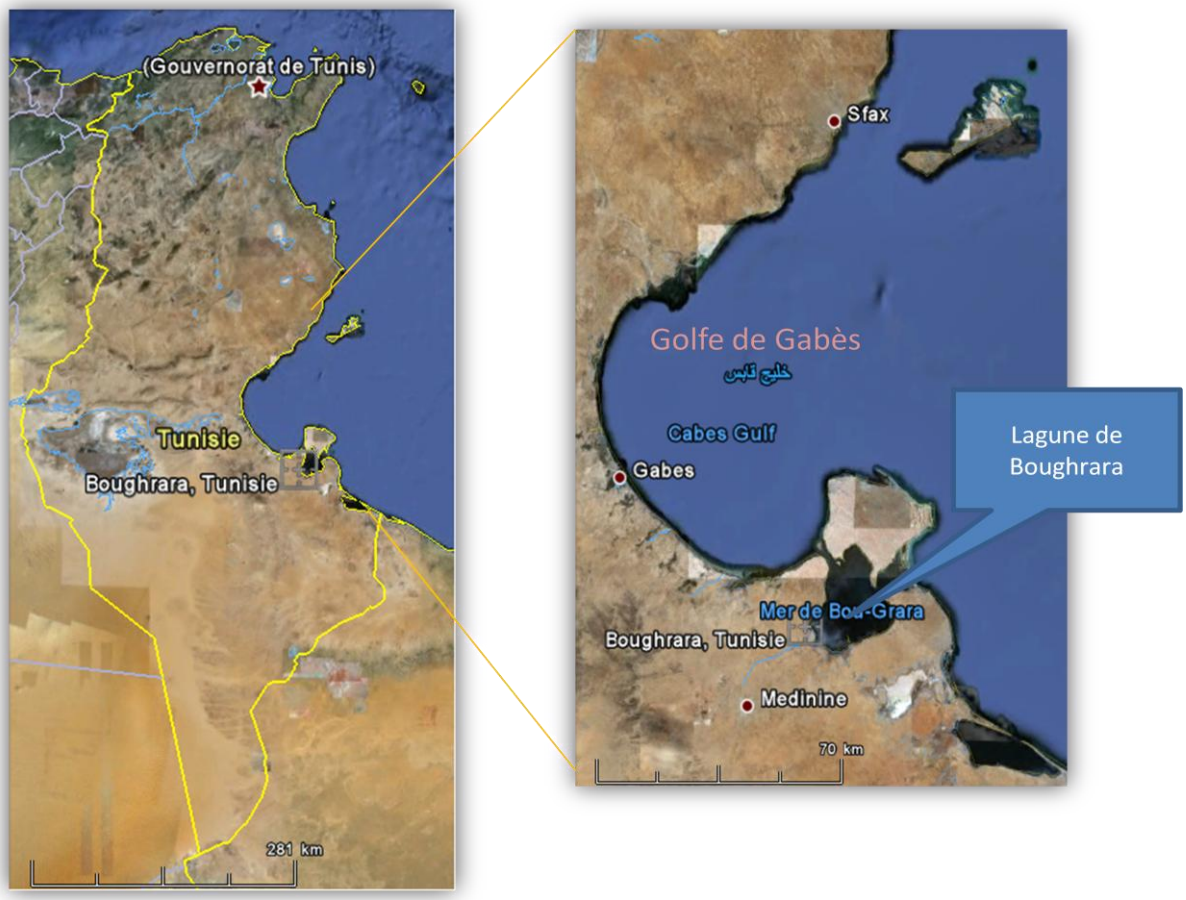


Figure 10 *: Emplacement du prélèvement (Lagune de Boughrara, golfe de Gabès, Tunisie) (Source : Google Earth 2010)*

La variation de la salinité mensuelle au cours de l'année 1999/2000 a montré un maximum de 48,8 en septembre et un minimum de 47 au mois de mai. Un gradient croissant de salinité a été signalé depuis la zone à influence marine vers la rive sud de la lagune (Anonyme, 2000).

Dans le golfe de Gabès, avec lequel la lagune de Boughrara est en communication, sévissent depuis 1988, en période estivale, des phénomènes d'eaux colorées dont les espèces responsables sont, selon les années, des cyanobactéries, des diatomées et/ou le plus fréquemment des dinoflagellés en particulier l'espèce *Karenia selliformis*.

Karenia selliformis

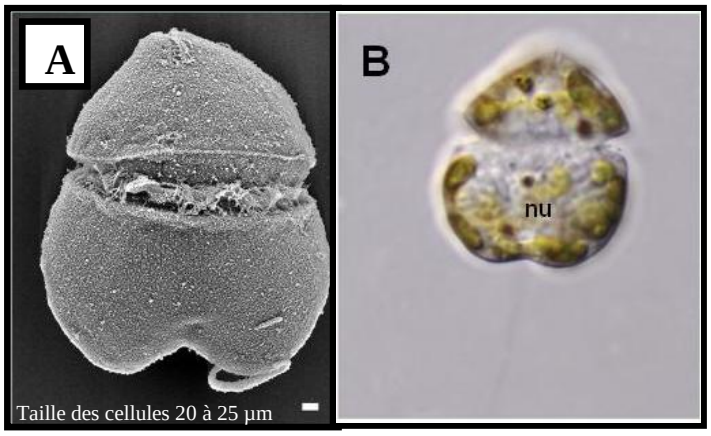


Figure 11 **:** Photographie au microscope de *Karenia selliformis*.
A : Microscope électronique ; **B** : Microscope optique (Robert *et al.*, 2004).

Karenia selliformis (Figure 11) connue aussi comme *Gymnodinium maguelonnense* est un dinoflagellé de la Classe des Dinophyceae. La cellule mesure environ 25 µm de longueur, 20 µm de largeur et 10 µm d'épaisseur. L'épisome est conique à hémisphérique. Ce dinoflagellé libère une toxine appelée gymnodimine et a été responsable d'un épisode de fortes mortalités de poissons en 1994, (Hamza et El Abed, 1994) et en septembre 2004, avec 187 tonnes de poissons retrouvés morts dans le golfe de Gabès (Tunisie).

2.2. Déroulement du bio-essai et protocole des expérimentations

Les prélèvements d'eau de mer ont été réalisés en sub-surface pendant une période de bloom de *K. selliformis* en décembre 2008. L'eau était filtrée sur une toile à bluter de

100 µm pour éliminer les plus gros organismes du zooplancton susceptibles de consommer le phytoplancton, tout en conservant les cellules en chaîne du phytoplancton. 90 L d'eau de mer ont ainsi été prélevés et conservés en bidons opaques. Les essais ont été effectués en grands volumes pour permettre un suivi qualitatif et représentatif du milieu naturel. L'étude a été réalisée dans des microcosmes constitués de bouteilles en plastique transparent (polyéthylène téréphtalate de qualité alimentaire) de 20 L. A l'arrivée au laboratoire, l'eau de mer a été distribuée dans les microcosmes à raison de 10 L par bouteille et acclimatée pendant 24 h dans la chambre de culture (20 °C, photopériode de 16 h, 60 µmol / m^2 /sec de PAR). Pour assurer la croissance phytoplanctonique, différents éléments nutritifs ont été ajoutés : des oligoéléments (traces métalliques et vitamines) et du Fe-EDTA et des macroéléments (N, P) aux concentrations rencontrées en milieu naturel dans le golfe de Gabès (Tableau 4). Avant l'ajout des contaminants, un premier échantillon a été prélevé et fixé au lugol pour réaliser le dénombrement et l'identification des espèces présentes dans l'eau de mer à t_0.

Composition des milieux auxquels ont été exposées les communautés de phytoplancton :
- le fongicide époxiconazole en formulation commerciale (Opus) aux concentrations effectives de 0,036 et 0,36 µg/L ;
- l'insecticide chlorpyriphos-éthyl en formulation commerciale (Dursban) aux concentrations effectives de 0,5 et 5 µg/L ;
- l'adjuvant nonylphénol aux concentrations effectives de 0,25 et 2,5 µg/L ;
- le mélange d'Opus (0,036 µg d'époxiconazole/L) et de Dursban (0,5 µg de chlorpyriphos-éthyl/L).

Des prélèvements quotidiens de 300 mL ont été réalisés pour, d'une part, l'examen de la composition floristique et le suivi des principales espèces et, d'autre part, pour une mesure de la chlorophylle a et des sels nutritifs. Les cultures ont été poursuivies jusqu'au déclin des populations phytoplanctoniques.

2.2.1. Dosage de la chlorophylle a dans les milieux de culture

Des volumes de 200 mL de cultures sont filtrés (Whatman, GF/C, 1,2 µm) et l'extraction du pigment est réalisée avec de l'acétone à 90 % (Lorenzen, 1967). Après passage au Vortex, une centrifugation de 10 min est effectuée à 5 000 tours/min. Une première

mesure de l'absorbance (A) du surnageant est effectuée aux longueurs d'ondes de 665 et 750 nm (spectrophotomètre Jenway 6705). Ensuite un volume de 0,2 mL d'acide chlorhydrique (1 % v/v) est ajouté à la cuve et après 2-5 min une deuxième mesure de l'absorbance est effectuée aux mêmes longueurs d'ondes (665 et 750 nm). La concentration en chlorophylle a est déterminée selon les équations de Lorenzen (1967) et exprimée en mg/m^3.

$$\textbf{Chlorophylle a} = 11.4*K*((A665o - A750o) - (A665a - A750a))*Ve / L*Vf$$

Avec :

A665o = absorbance à 665 nm avant l'acidification

A750o = absorbance à 750 nm avant l'acidification

A665a = absorbance à 665 nm après l'acidification

A750a = absorbance à 750 nm après l'acidification

K= R/(R-1) = 2.43

Ve= Volume d'extraction (mL)

Vf= Volume filtré (L)

L= Longueur du trajet optique de la cuve (cm)

2.2.2. Analyses chimiques sur les milieux de culture

2.2.2.1. Dosage des sels nutritifs

Le dosage des sels nutritifs (nitrites, nitrates, phosphore et ammonium) dans l'eau a été réalisé par colorimétrie suivant quatre analyses indépendantes grâce à l'auto-analyseur (Bran-Luebbe Autoanalyseur 3), qui permet une analyse rapide et précise de ces nutriments.

2.2.2.2. Nitrates (NO_3^-)

La méthode de Wood et *al*. (1967) permet la mesure de faibles concentrations en nitrates dans l'eau de mer. Les nitrates sont réduits en nitrites par passage sur une colonne cadmium-cuivre et les nitrites sont ensuite déterminés colorimétriquement, selon la technique décrite par Strickland et Parsons (1972). Après diazotation avec la sulfanilamide et copulation du composé diazoïque obtenu, la quantification des nitrites

est réalisée par mesure de la longueur d'onde à 545 nm (spectrophotomètre UV visible (Jenway 6705).

La méthode utilisée, basée sur la réaction de Griess, a été appliquée à l'eau de mer par Bendschneider et Robinson (1952), et constitue une des méthodes les plus sensibles et les plus spécifiques pour l'analyse des eaux naturelles.

2.2.2.3. Ammonium (NH_4^+) (Koroleff, 1969)

Le principe du dosage est basé sur le fait qu'en milieu alcalin (8< pH >11,5), l'ammonium dissous réagit avec l'hypochlorite de sodium pour former une monochloramine. En présence d'un excès d'hypochlorite (milieu oxydant) et de phénol et chauffage à 80 °C, il y a formation du bleu d'indophénol. La longueur d'onde est mesurée à 630 nm.

2.2.2.4. Phosphore minéral (PO_4^{3-}) (Riley *et al.*, 1972 ; Koroleff, 1976)

L'analyse du phosphore est basée sur la formation d'un complexe phosphomolybdique (molybdate d'ammonium) et la réduction par l'acide ascorbique. Le développement de la coloration est accéléré par chauffage à 37 °C et la densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 880 nm.

2.2.2.5. Silicates ($Si(OH)_4$)

Les ions silicates et molybdates réagissent en milieu acide (1< pH > 2) pour former un hétéropolyanion, le complexe est ensuite réduit en bleu de molybdène par une solution de métol et de sulfite de sodium. La réaction est accélérée par chauffage à 37 °C et l'absorption est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 660 nm (Mullin et Riley, 1955).

III. Les bio-essais sur les animaux

Les espèces animales utilisées dans ce travail ont été retenues d'une part, pour leur appartenance aux quatre niveaux trophiques animaux recommandés par le TGD marin (TGD, 2003), et d'autre part pour leur présence sur le littoral tunisien. Trois des quatre niveaux trophiques ont été étudiés : échinoderme, mollusque et poisson. Les effets des « contaminants » ont été évalués par exposition directe des espèces étudiées pendant différents stades de développement et par action indirecte *via* l'alimentation. Cette

évaluation de l'effet par empoisonnement secondaire a été réalisée sur le naissain de palourde.

1. Test oursin

1.1. Description et mode de vie

L'oursin atlantico-méditerranéen *Paracentrotus lividus* (Figure 12) est un invertébré de l'embranchement des échinodermes, ordre des diadématoïdes et famille des échinides. Il est présent depuis les côtes de l'Irlande jusqu'au sud du Maroc et partout sur toutes les côtes méditerranéennes (San Martin, 1995). Cet invertébré marin est inféodé de l'étage médiolittoral à infralittoral allant jusqu'à une profondeur de – 80 m (Tortonese, 1965 ; Fenaux, 1968 ; Munar & Moreno, 1987 ; Bayed *et al*., 2005). Cet oursin commun utilise comme refuges différents habitats qu'ils soient rocheux, sablonneux, fonds de maerl et même des prairies de posidonies.



Figure 12 : *Paracentrotus lividus*
(Source : marine-genomics-europe.or)

En Tunisie, Péres et Picard (1956), ont mentionné la présence de *P. lividus* au large des côtes tunisiennes à des profondeurs comprises entre 18 et 25 m, sur les dalles de grès calcaires et dans le golfe de Gabès à 60 m sur du sable vaseux. Dans le golfe de Tunis, Cherbonnier (1956) a récolté cette espèce entre 0 et 30 m de profondeur, aussi bien sur les fonds rocheux que dans les herbiers de Posidonie. Sur les concrétions coralligènes, *P. lividus* ronge la couche de Lithothamniées sur quelques centimètres d'épaisseur et forme ainsi une loge. Le même phénomène a été observé sur des falaises littorales. Ils sont herbivores, broutant les algues et les végétaux tapissant les rochers grâce à cinq puissantes mâchoires composant son appareil masticateur ou lanterne d'Aristote.

1.2. Reproduction et développement embryo-larvaire

Chez l'oursin, les sexes sont séparés sans dimorphisme sexuel externe. Comme tous les échinodermes il a une structure pentaradiée : les cinq glandes génitales sont granuleuses et jaune-orange chez la femelle, plus fines et d'un jaune plus pâle chez le mâle, elles sont disposées en rayon autour de l'anus à l'intérieur du test. Les gamètes mâles et femelles, parvenus à maturité, sont émis directement dans l'eau, par les pores génitaux. Le déclenchement de la ponte est lié à l'augmentation de la température de l'eau. La fécondation est externe et produit alors un zygote (ou œuf). Le développement de cet œuf aboutit à l'obtention d'une larve *pluteus*, à partir de laquelle se formera l'oursin. La larve appartient au méroplancton où elle vit pendant un à deux mois, jusqu'à ce que sa morphologie adulte lui permette de rejoindre son habitat benthique (Verlaque, 1984).

1.3. Le bio-essai oursin

Le bio-essai oursin (Lassus *et al.,* 1990 ; Quiniou et Guillou, 1990 ; Pagano et Trieff, 1992 ; Guillou *et al.*, 2000 ; Lorenzo *et* al. 2002 ; Bayed *et al.* 2005) a été réalisé selon Fernández et Beiras (2001) et la réponse biologique étudiée est basée sur le pourcentage de réussite de l'embryogenèse.

Des individus adultes de *P. lividus* ont été collectés auprès de la population subtidale de Canido (42° 11' 36" N, 8° 49' 30" W), Galice (Espagne). La dissection des individus matures permet de prélever, à l'aide d'une pipette quelques gamètes mâles et femelles directement dans les gonades.

La sélection des gamètes se fait après observation au microscope et permet de sélectionner d'une part, l'individu mâle présentant des spermatozoïdes mobiles et, d'autre part, l'individu femelle possédant des ovocytes sphériques. Quelques microlitres de sperme dense sont alors prélevés directement dans la gonade à l'aide d'une pipette Pasteur et ajoutés à la suspension d'ovocytes (50 000 à 100 000 ovocytes) dans de l'eau de mer de référence puis délicatement agitée pour permettre la fécondation. Quatre échantillons de 20 µl ont été ensuite prélevés et observés au microscope afin de contrôler le taux de fécondation et déterminer la densité d'œufs.

Le succès de la fécondation (indiqué par le soulèvement de la membrane de fécondation) est en général supérieur à 98 % pour tous les essais biologiques. Dans les 30 min qui suivent la fécondation, un volume correspondant à 600 œufs fécondés a été transféré dans des fioles cylindriques en verre de 20 mL contenant le contaminant étudié et cinq réplicats par concentration de contaminant ont été réalisés. Après incubation à 20 ± 1 °C pendant 48 h à l'obscurité, deux gouttes de formol neutre (8 %) sont ajoutées au milieu. Le succès de l'embryogenèse a été évalué au microscope inversé (objectif 20 X) par mesure de la longueur des larves *pluteus* à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (Leica Qwin). Le développement des larves traitées a été exprimé en pourcentage de celui des larves témoins.

2. Tests sur bivalves

Deux espèces de bivalves ont été utilisées : l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) avec une étude du développement embryo-larvaire et la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) qui a fait l'objet d'une évaluation de la sensibilité de ses différents stades de développement : embryo-larvaire, métamorphose et croissance du naissain, aux contaminants étudiés. Le développement embryo-larvaire est une des phases du développement reconnue comme la plus sensible aux conditions du milieu et représente une condition fondamentale pour le maintien des peuplements dans le milieu naturel (Woelke, 1972 ; Beiras et His, 1995 ; His *et al*., 1999 ; Geffard 2001, Quiniou *et al.,* 2005 ; Afnor, 2009).

La métamorphose est un stade critique dans le développement de la palourde permettant le passage de l'animal de la vie pélagique nageuse à la vie benthique sédentaire et pendant laquelle des mortalités considérables se produisent aussi bien en milieu naturel qu'en écloserie.

Les essais sur la croissance du naissain permettent d'évaluer les dangers auxquels sont exposées les larves selon les «contaminants » présents dans le milieu pendant cette phase très sensible et décisive pour le maintien de l'espèce. Une évaluation de l'effet des « contaminants » par empoisonnement secondaire *via* l'alimentation a été réalisée sur le naissain de palourde

2.1. L'huître creuse (*Crassostrea gigas*)

2.1.1. Description et mode de vie

L'huître japonaise *Crassostrea gigas* (Figure 13) ou huître creuse est un mollusque bivalve filtreur de la famille des ostréidés, originaire du Pacifique (Nord-Ouest). Elle peuple les zones intertidales et infra-littorales en se fixant sur les substrats. *C. gigas* a été introduite dans de nombreuses régions du monde à des fins commerciales. Il s'agit aujourd'hui de l'espèce d'huître la plus cultivée au monde.



Figure 13 **:** *Crassostrea gigas*
(Source : mer-littoral.org)

En Tunisie, *C. gigas* a été introduite pour la première fois en 1972 dans la lagune de Bizerte. Le naissain fut tout d'abord importé du Japon puis, par la suite, de la France (Medhioub, 1993).

2.1.2. Biologie et développement embryo-larvaire

C. gigas est une espèce ovipare hermaphrodite protandre de type irrégulier alternatif.
Les individus matures sont soit mâles soit femelles (les cas d'hermaphrodisme simultané sont très minoritaires). Ils peuvent changer de sexe soit au cours d'une même saison de reproduction (rarement), soit au cours de saisons consécutives. Il existe une certaine protandrie chez cette espèce (pourcentage de mâles élevés chez les individus de un an atteignant 70 %). Au cours de la seconde saison de reproduction, on observe 50 à 60 % de femelles tandis que, dans une population plus âgée, les femelles sont nettement dominantes (Auby et Maurer, 2004). La différenciation des sexes s'effectue à l'automne précédant la saison de reproduction (Galtsoff, 1964 ; Lubet, 1981). Les mécanismes physiologiques contrôlant le déterminisme des changements de sexe sont encore mal connus. Les facteurs externes (température, nutrition) peuvent déclencher les

changements de sexe et même fortement influencer les sex-ratios (Gérard et al., 1995 ; Lango-Renoso et al., 1999).

La gonade de l'huître n'est pas un organe permanent. Elle se développe autour de la glande digestive à chaque cycle de reproduction lors de la gamétogenèse active et devient l'organe le plus volumineux de l'animal (Galstoff, 1964) puis régresse après l'émission des gamètes.

La fécondité de *C. gigas* est très élevée. Une femelle peut en effet émettre de 20 à 100 millions d'ovocytes lors de la ponte qui a lieu une ou plusieurs fois par an lorsque la température de l'eau est supérieure à un seuil d'environ 18 – 20 °C (Mann, 1979). Les divisions cellulaires sont rapides et l'embryon qui est une larve trochophore se différencie, 24 h après la fécondation, en une larve "D" d'environ 70 µm dans les conditions des bio-essais à une température de 24 ± 1 °C. Un *velum* se développe ensuite donnant une larve véligère.

Les larves nageantes font partie du méroplancton et vont dériver avec la masse d'eau pendant environ deux à trois semaines selon les conditions du milieu. Un pied se développe enfin, d'où le nom de larve pédivéligère, signalant la fin de la vie pélagique de l'huître. La larve recherche alors un substrat dur favorable à sa fixation. La métamorphose s'achève par la résorption du *velum* et du pied et l'huître est appelée 'naissain'. L'animal à l'état naturel, vit fixé sur son support après le passage au stade plantigrade (Weiner *et al*., 1989) ; il sécrète sa coquille définitive, la dissoconque.

2.1.3. Bio-essai sur le développement embryo-larvaire de *C. gigas*

Le bio-essai a été réalisé selon la norme T90 XP-283 (AFNOR, 2009) issu du protocole de Quiniou *et al.* (2005) : bio-essai d'écotoxicité aquatique sur le développement embryo-larvaire de bivalves.

Les géniteurs de *C. gigas* employés provenaient de la rade de Brest (France) pendant la période de maturation sexuelle (juin à septembre). L'émission de gamètes a été provoquée par deux chocs thermiques successifs (18 °C et 28 °C). Après sélection des gamètes, la fécondation a été réalisée en eau de mer de référence et les œufs fécondés exposés à la gamme des contaminants étudiés, en pots de polystyrène cristal stériles de

30 mL. Cinq réplicats sont réalisés pour chaque concentration de contaminant préparés au préalable.

Après une incubation de 24 ± 3 h à 24 ± 1 °C, les élevages ont été fixés au formol neutre (8 %) et les taux de développements normaux et anormaux déterminés sur 100 larves directement dans les milieux de culture à l'aide d'un microscope inverse. Les résultats ont été exprimés en pourcentages bruts d'anomalies et en pourcentages nets d'anomalies et les tests validés avec le cuivre comme toxique de référence.
Les types d'anomalies sont variés et peuvent être classés selon trois degrés de toxicité (Quiniou *et al.*, 2005) :

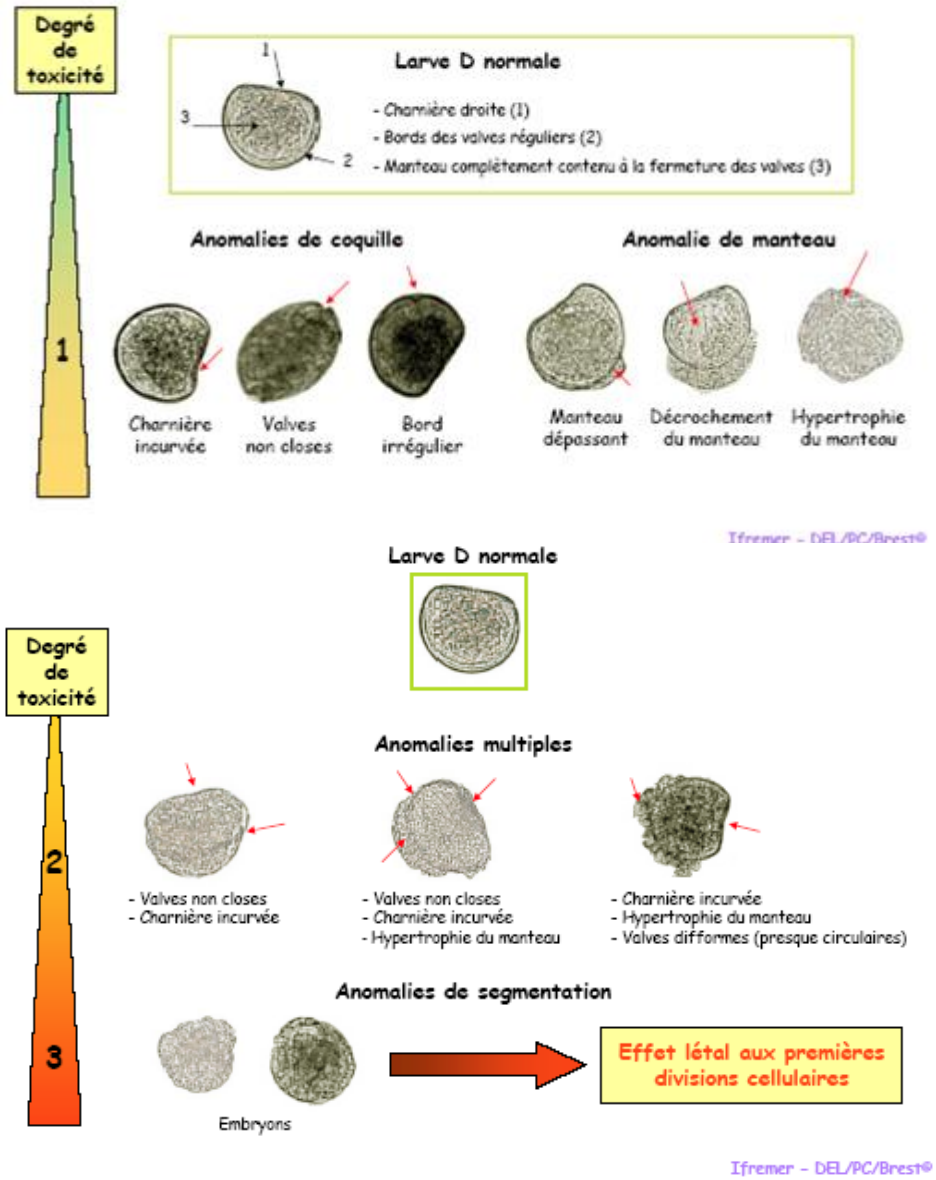


Figure 14 *: Types d'anomalies du développement embryo-larvaire chez l'huître creuse C. gigas (Quiniou et al., 2005).*

2.2. La palourde (*Ruditapes philippinarum*)

L'effet des contaminants chimiques a été évalué sur différents stades du développement chez la palourde *R. philippinarum.* Une évaluation de l'effet direct des contaminants mais aussi une étude de leur action par empoisonnement secondaire a été réalisée sur le naissain.

2.2.1. Description et mode de vie

La palourde japonaise *R. philippinarum* (Figure 15), comme l'huître, est un mollusque bivalve de la famille des vénéridés, originaire de la province indo-pacifique (Ponurovsky et Yakovlev, 1992). Son habitat est constitué par des baies abritées (lagunes, estuaires) où elle occupe la frange médio-littorale (Le Treut, 1986).



Figure 15 : *Ruditapes philippinarum*

(Source: nature22.com)

Depuis le début du 20ème siècle, cette espèce a été introduite dans différentes parties du monde, accidentellement avec l'importation du naissain de l'huître japonaise *C. gigas* ou volontairement pour l'aquaculture (Le Treut, 1986). On peut observer des populations naturelles des côtes atlantiques bretonnes aux rias espagnoles, ainsi qu'en Méditerranée et en Adriatique. De nos jours, la palourde japonaise se distribue sur les côtes entre les latitudes 25 °N et 45 °N dans tout le globe ainsi que dans certaines zones lagunaires et estuariennes du bassin méditerranéen et en particulier en Tunisie dans le lac de Tunis (Bensouissi *et al*., 2005 ; Ponurovsky et Yakokvlev, 1992).

2.2.2. Biologie et développement embryo-larvaire

La palourde japonaise est une espèce gonochorique. La période de reproduction s'étend de juin à septembre. La première maturation sexuelle est obtenue dès la première année. Le cycle de reproduction débute lorsque la température avoisine les 15 – 20 °C.

Après un mois de maturation en milieu naturel, la ponte est déclenchée par l'augmentation de la température de l'eau. Les géniteurs expulsent leurs gamètes par le siphon exhalant. Lorsque les conditions sont réunies, il peut y avoir deux pontes au cours de la même saison, une à la fin du printemps et l'autre à la fin de l'été.

Une femelle peut émettre jusqu'à trois millions d'ovocytes. La fécondation est externe et le développement embryo-larvaire est très similaire à celui de l'huître. Après une courte vie planctonique, les larves se posent sur le fond et adoptent une vie benthique. A ce stade, la jeune palourde mesure 0,5 mm (FA0, 2005).

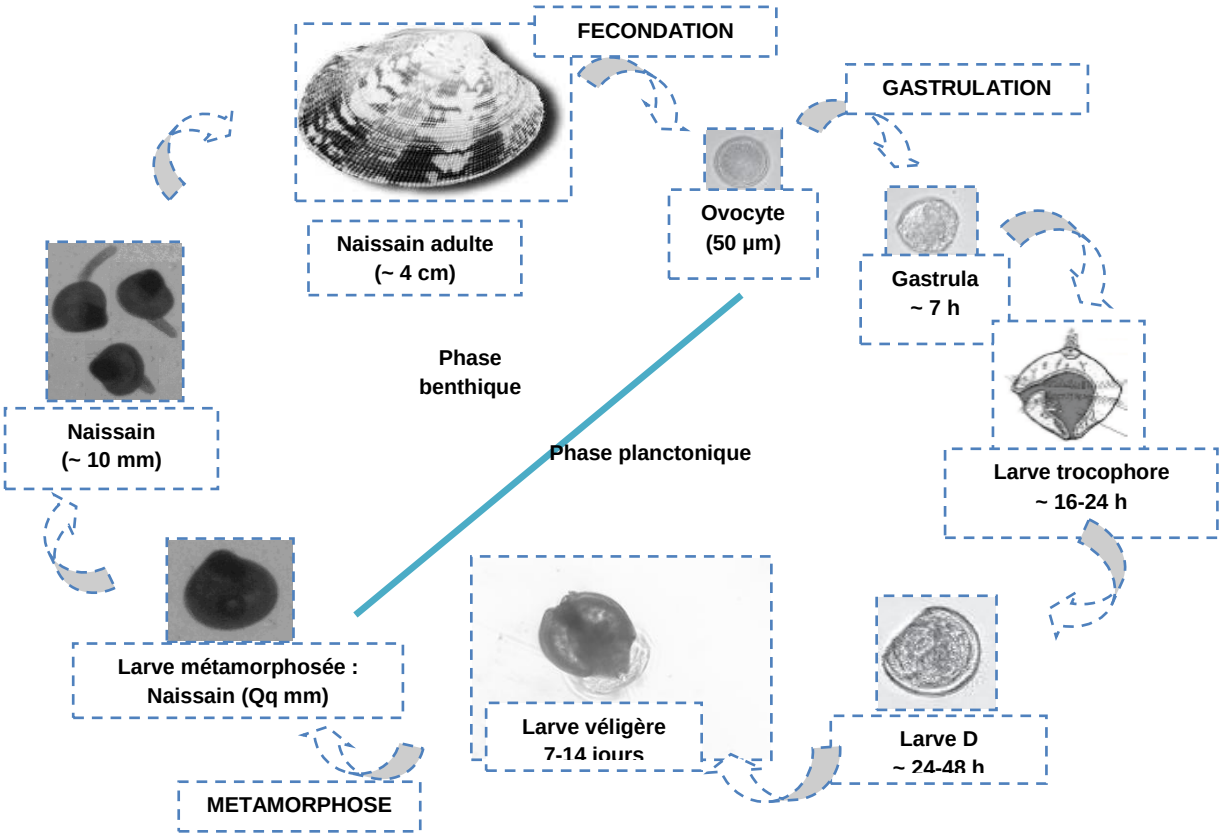


Figure 16 : *Cycle de développement de la palourde japonaise Ruditapes philippinarum (selon Fabioux, 2004 - modifié).*

2.2.3. Bio-essai sur le développement embryo-larvaire de *R. philippinarum*

Les géniteurs *R. philippinarum* provenaient du milieu naturel, de la Ria de Vigo (Espagne) pendant la période de maturation sexuelle (juin à septembre). Les bio-essais ont été réalisés comme décrit précédemment pour l'huître creuse (paragraphe 1.1.3.) en

incubant les œufs de palourde fécondés dans les milieux à tester pendant 48 h à 20 ± 1 °C et à l'obscurité selon Beiras et Albentosa (2004). Les milieux ont été fixés par la suite au formol neutre, les taux de développements normaux et anormaux déterminés directement dans les milieux de culture sur 100 larves, à raison de quatre à cinq replicats pour chaque concentration, à l'aide d'un microscope inverse. Les résultats ont été exprimés en pourcentages bruts d'anomalies et en pourcentages nets d'anomalies. Les tests ont été validés par un essai sur le cuivre pris comme toxique de référence, utilisé dans les mêmes conditions que les autres contaminants.

2.2.4. Bio-essai sur la métamorphose et la croissance en microcosmes du naissain de *R. philippinarum*

2.2.4.1. Obtention des gamètes et production des larves à tester

Un couple de géniteurs de *R. philippinarum*, provenant du milieu naturel de la Ria de Vigo (Espagne) a servi de reproducteurs pour l'approvisionnement en larves et en naissain de palourde. L'obtention de gamètes et la fécondation ont été réalisées de la même manière que pour le bio-essai sur le développement embryo-larvaire, en utilisant un seul mâle et une seule femelle pour l'obtention de toutes les larves de l'étude. Après fécondation, quelque cinq millions de larves D ont été obtenues avec une perte négligeable (mortalité et œufs non fécondés < 10 %). L'élevage des larves jusqu'au stade de la métamorphose et au stade naissain ainsi que la réalisation du bio-essai sur ces deux stades ont été effectués dans l'écloserie de la station des sciences marines (ECIMAT) de Vigo (Espagne).

Les larves ont été élevées jusqu'au stade de la métamorphose dans un bac de 150 L, rempli d'eau de mer naturelle préalablement filtrée (filtre de porosité 1 µm) et stérilisée par les radiations UV et une ration alimentaire de phytoplancton a été ajoutée à raison de 100 cellules / µL (50 % T-iso, 25 % *C. gracilis* et 25 % *T. suecica*). Toutes les 48 h, l'eau du bac a été renouvelée avec apport d'une nouvelle ration de microalgues. La croissance des larves a été contrôlée tous les deux jours, par une mesure de la taille, un suivi du développement et l'observation de la mobilité des larves au microscope. Après 25 j d'élevage, les larves ont été tamisées et transférées dans des incubateurs en fonction de leur taille, avec une alimentation en eau de mer en circuit ouvert complémentée par ajout de phytoplancton.

2.2.4.2. Bio-essai sur la métamorphose des larves de *R. philippinarum*

Dès l'observation des premières larves pédivéligères (34 j après la fécondation), un essai d'induction de la métamorphose a été effectué permettant l'obtention de 57 % de larves métamorphosées : perte du *velum*, développement du pied. Les larves véligères sont alors récupérées dans un bécher et la métamorphose induite par un neuromédiateur, l'épinéphrine (10^{-6} M) (Beiras et His, 1994) qui a été démontré être un inducteur actif de la métamorphose chez les bivalves (Garcia-Lavandeira *et al.*, 2005) . Le bio-essai est réalisé dans des plaques « cellstar » de 12 puits avec couvercle, à raison de 100 larves par puits dans 3 mL de milieu en présence ou non des différents traitements dont le toxique de référence (huit réplicats /traitement), sans apport alimentaire. Après une incubation de 48 h à 20 ± 1 °C et à l'obscurité, les larves sont dénombrées sous loupe binoculaire sans fixation et classées par catégories : larves mortes, larves (véligères), post-larves et larves à métamorphose incomplète. Les résultats ont été exprimés en nombre bruts et en pourcentages.

2.2.4.3. Bio-essai sur la croissance du naissain de *R. philippinarum*

Quarante huit jours après la ponte, les larves qui se sont métamorphosées, ont gagné le fond des incubateurs et sont devenues des naissains de palourde. Le bio-essai sur la croissance du naissain a été réalisé dans des mini-incubateurs fabriqués spécialement et immergés dans des béchers en verre de un litre. 500 naissains ont été aléatoirement prélevés et distribués dans les mini-incubateurs remplis de 700 mL d'eau de mer de référence stérile (salinité de 34 ± 1), contaminée ou non avec les toxiques à tester. L'ensemble a été placé à l'obscurité, dans une chambre thermostatée (18 ± 1 ºC).

Durant la période d'exposition de 13 j, l'alimentation est apportée sous forme de *T-iso* (40 cellules /µL) et un bullage d'air en permet l'homogénéisation ; l'eau de mer ainsi que les contaminants étudiés ont été renouvelés toutes les 48 h. Des photographies des naissains ont été prises à la loupe binoculaire (Nikon SMZ1000) et leur taille mesurée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (ImageJ).

Pour l'étude de l'action indirecte des contaminants sur la croissance du naissain, des cultures de *T-iso* en phase exponentielle de croissance ont été exposées pendant 24 h à 21 °C, à l'obscurité aux contaminants chimiques étudiés : nonylphénol 1,5 µg/L et 15

µg/L ; Opus 5,16 µg/L et 51,6 µg/L ainsi qu'un mélange correspondant aux concentrations les plus faibles à savoir 1,5 µg de nonylphénol/L + 5,16 µg d'Opus/L.

Après plusieurs lavages à l'eau de mer de référence, suivis d'une centrifugation, les cellules de microalgues contaminées sont récupérées et ajoutées aux mini-incubateurs, à raison de 40 cellules/µL et l'expérience est conduite comme précédemment pendant 12 jours avec un renouvellement de l'eau de mer de référence et de la ration d'algues contaminées toutes les 48 h. Le nombre de cellules de *T-iso* non consommées dans chaque microcosme a été déterminé toutes les 48 h, à l'aide du compteur de particules (Beckman Coulter).

3. Test poisson

3.1. Description et mode de vie

Le turbot : *Psetta maxima* anciennement *Scophtalmus maximus* (Linné, 1758) (Figure 17), est un poisson téléostéen de l'ordre des Pleuronectiformes et de la famille des Scophtalmidés. C'est un poisson plat pouvant atteindre une taille d'un mètre, présentant un corps presque rond, asymétrique, avec les yeux localisés sur le côté gauche. Sa peau est parsemée de tubercules osseux. Les rayons antérieurs de la dorsale non forchus sont réunis par une membrane jusqu'à leur sommet.



Figure 17 : *Psetta maxima*
(Source : Luc Viatour.jpg)

Le turbot vit sur les fonds sablonneux ou sur les gravières à des profondeurs de 10 à 250 mètres. Retrouvé depuis les côtes de la Norvège jusqu'au Maroc, il est également présent en Méditerranée et en Mer Noire (Blanquer *et al.,* 1992). Les juvéniles vivent près des rivages sur les plages et gagnent le large lorsqu'ils sont adultes.

Si les individus adultes tolèrent une vaste gamme de températures, en revanche, leur reproduction exige une température élevée en été. Carnivore, les juvéniles s'alimentent de mollusques et de crustacés, et les adultes principalement de poissons et de céphalopodes.

3.2. Reproduction et développement larvaire

Le turbot est une espèce « gonochorique » où les individus sont soit mâles soit femelles. Les femelles atteignent leur maturité sexuelle à l'âge de trois ans. La taille de la première maturité sexuelle est de 41 à 51 cm. Le turbot est une espèce très féconde, chaque ponte est constituée de centaines de milliers d'œufs (diamètre moyen, 1 mm). A l'éclosion, la larve (taille d'environ 3 mm) paraît très primitive et immature, mais elle acquiert en moins d'un mois la morphologie et le niveau d'organisation de l'adulte.

La ponte (séquentielle, chaque 2-4 jours) a lieu normalement entre février et avril en Méditerranée, et entre mai et juillet en Atlantique. Les œufs présentent une seule goutte lipidique. Les larves sont initialement symétriques, mais à la fin de la métamorphose (40-50 jours, 25 mm) l'oeil droit migre vers la gauche, en augmentant l'asymétrie (Déniel, 1973 ; Quiniou, 1986).

3.3. Le bio-essai Turbot

Les oeufs fécondés d'un même couple de géniteurs de turbot proviennent d'une écloserie de poissons (PESCANOVA : Insuiñas Mougas, Galice, Espagne). Les œufs, placés dans des sacs en plastique remplis d'eau de mer (5 L), sont transportés au laboratoire dans une boîte isotherme puis maintenus dans des aquariums contenant de l'eau de mer naturelle de référence filtrée à 1 µm et stérilisée aux ultraviolets (salinité 34). Les œufs ont ainsi été acclimatés pendant 24 h à 14 ± 1 º C (température d'élevage en écloserie), avant les expositions expérimentales aux toxiques.

Dans les 72 h suivant la fécondation, les œufs sont triés : les œufs fécondés flottent et peuvent facilement être récupérés ; les œufs non fécondés qui sédimentent sont éliminés. Cinquante œufs fécondés sont aléatoirement prélevés et distribués dans des béchers de un litre contenant 500 mL d'eau de mer de référence, préalablement filtrée (sur membrane de porosité 1 µm) et stérilisée par les radiations UV, contaminée ou non avec le toxique à tester. Les béchers sont placés dans une chambre thermostatée

(18 ± 1 ºC), à l'obscurité pendant une période d'exposition de 7 j. Les conditions physico-chimiques des expériences ont été les suivantes : salinité 34,20 ± 0,15 ; 7,32 ± 0,70 mg d'O_2 /L et pH de 8,29 ± 0,11 (moyenne ± ES, n = 15). Les essais se sont déroulés pendant 6 j sans apport alimentaire ni aération.

Le dispositif expérimental a été réalisé selon les recommandations des lignes directrices de l'OCDE (OCDE n° 210 et 212, 1993 et 1998) et de la Commission européenne : directive 92/69/CEE, avec quelques modifications précisées ci-dessous.

Toutes les expériences ont été effectuées en utilisant un test semi-statique avec renouvellement de l'eau et des concentrations en contaminants toutes les 48 h. Pour ce faire, les œufs sont récupérés dans un tamis (100 µm de vide de maille), rincés à l'eau de mer de référence puis transférés délicatement dans un nouveau bécher.

Le pourcentage d'éclosion est déterminé 24 h après le début de l'expérience puis un suivi de la mortalité des larves est effectué tous les 2 j pendant la période des 6 j suivants (Mhadhbi *et al.*, 2010).

Un récapitulatif des différents bioessais réalisés et des contaminants utilisés est rapporté dans le tableau 5.

Tableau 5 : Récapitulatif des différents bio-essais réalisés et des contaminants étudiés (substances actives et formulations).

Bio-essais	Cuivre	Nonylphénol	Epoxiconazole	Opus®	Dursban®	Mélange1 : Dursban® + Opus®	Mélange 2 : Nonylphénol + Opus®
Microalgues		X	X	X			
Communautés naturelles du golfe de Gabès		X		X	X	X	
Oursin (développement embryo-larvaire)	X	X	X	X			
Huître (développement embryo-larvaire)	X	X	X	X			
Palourde (développement embryo-larvaire)	X	X	X	X			
Palourde (métamorphose)	X	X	X	X			
Palourde (croissance du naissain)	X	X	X	X			
Palourde (empoisonnement secondaire du naissain *via T-iso*)		X		X			X

IV. Traitement statistique des données

Pour les bio-essais micro-algues, les CSEO (correspondant aux CE_{10}) et la CE_{50} sont calculées au moyen du logiciel REGtox® (Vindimian *et al.*, 1983). Cet outil de régression non linéaire permet d'estimer les Concentrations d'Effet (CEx) ainsi que leurs intervalles de confiance (95 % et 99%). Les intervalles de confiance sur les paramètres mesurés sont estimés par une simulation de type «Bootstrap» qui est totalement non paramétrique et considérée comme bien adaptée aux modèles non linéaires.

Pour les bio-essais oursin, palourde et turbot, les CSEO, les CE_{50}, les CL_{50}, les CE_{10} et les CL_{10} (les deux dernières correspondant aux valeurs calculées de CSEO) et leurs intervalles de confiances à 5 % ont été calculés selon la méthode des probits après normalisation des données sur la réponse moyenne des témoins en utilisant la formule d'Abbot (Emens, 1948). Pour les bio-essais huître, c'est le logiciel REGtox® (Vindimian *et al.*, 1983) qui a été employé.

Les résultats statistiques sont présentés comme moyennes ± erreur standard ; l'erreur standard est égale à l'écart-type divisé par la racine carrée de la taille de l'échantillon (nombre de réplicats). Les comparaisons statistiques des variables quantitatives ont été réalisées au moyen de l'analyse de variance selon le test *t* de student et les différences sont considérées comme significatives au seuil de $p = 0,05$. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Instat.

CHAPITRE III

EFFET DES CONTAMINANTS CHIMIQUES SUR LES MICRO-ALGUES MARINES

I. Etude de l'effet de l'époxiconazole

1. Comparaison de l'effet de l'époxiconazole sur la croissance des trois microalgues

1.1. Effet de l'époxiconazole (substance active)

Une étude comparative de l'action de l'époxiconazole sur la croissance de trois algues phytoplanctoniques : *C. calcitrans*, *I. aff. galbana* et *T. suecica* a été effectuée.

L'obtention des valeurs de CSEO et de CE_{50} après trois jours de culture montre une sensibilité différente des trois microalgues. *I. aff. galbana* s'avère être l'algue la plus sensible à cette molécule, avec des valeurs de CSEO de 0,86 mg/L et 0,57 mg/L et des valeurs de CE_{50} de 1,87 mg/L et 1,37 mg/L respectivement en milieux f/2 et G+ ; *T. suecica,* avec des valeurs de CSEO de 1,36 et 0,63 mg/L et des valeurs de CE_{50} de 2,45 et 1,73 mg/L, se révèle plus sensible à l'action du fongicide que *C. calcitrans* qui apparaît être la microalgue la moins affectée (Tableau 6).

Tableau 6 : CSEO et CE_{50} de l'époxiconazole (molécule pure) mesurées après trois jours de culture des trois algues dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue. Résultats exprimés en mg d'époxiconazole/L ± ES.

		C. calcitrans	*I. aff. galbana*	*T. suecica*
Milieu f/2	**CSEO**	1,68 ± 0,79	0,86 ± 0,23	1,36 ± 0,09
	CE_{50}	4,90 ± 0,46	1,87 ± 0,16	2,45 ± 0,20
Milieu G+	**CSEO**	0,74 ± 0,21	0,57 ± 0,19	0,63 ± 0,11
	CE_{50}	2,31 ± 0,18	1,37 ± 0,11	1,73 ± 0,11

1.2. Action de la formulation commerciale Opus

Lorsque l'époxiconazole est testé en formulation commerciale Opus dans le milieu de culture, une inhibition de la croissance des trois microalgues est également observée (Tableau 7).

Contrairement aux résultats observés en présence de la molécule pure, avec des valeurs de CSEO de 3,1 et 1,29 et de CE_{50} de 4,47 et 2,9 µg/L d'équivalents en substance active époxiconazole, respectivement en milieux f/2 et G+, *C. calcitrans* s'avère plus sensible à l'action du fongicide qu'*I. aff. galbana* pour laquelle des CSEO de 3,84 et 2,06 et de CE_{50} de 6,46 et 4,33 µg/L sont observées (Tableau 7). Il est à noter que pour ces deux algues, des valeurs de CSEO et de CE_{50} supérieures sont obtenues lorsque la culture est effectuée en milieu f/2. Aux concentrations en fongicide testées et pour les deux milieux de culture, en revanche, la croissance de *T. suecica* s'avère non affectée.

Tableau 7 : CSEO et CE_{50} de l'époxiconazole (Opus) mesurées après 3 jours de culture des trois algues dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue. Résultats exprimés en µg d'époxiconazole /L ± ES.

		C. calcitrans	*I. aff. galbana*	*T. suecica*
Milieu f/2	**CSEO**	3,1 ± 0,79	3,84 ± 0,55	> 100
	CE_{50}	4,47 ± 0,4	6,46 ± 0,62	> 100
Milieu G+	**CSEO**	1,29 ± 0,11	2,06 ± 0,09	> 100
	CE_{50}	2,9 ± 0,24	4,33 ± 0,37	> 100

Il est à noter que les valeurs des CSEO et de CE_{50} sont inférieures d'un facteur 10^3 à celles trouvées avec la molécule pure d'époxiconazole. Ces résultats suggèrent une action inhibitrice des co-formulants présents dans le produit (Opus) sur les microalgues étudiées.

2. Effet de l'époxiconazole (Opus) sur quelques paramètres physiologiques

En raison de la plus grande sensibilité de *C. calcitrans* à l'action de la formulation commerciale, cette microalgue a été retenue pour l'analyse de quelques paramètres physiologiques.

2.1. Effet sur la cinétique de croissance de *C. calcitrans*

L'action de l'époxiconazole, présent dans le milieu de culture, a été suivie sur la croissance de *C. calcitrans*, cultivée dans deux milieux de culture : f/2 et G+, sous deux conditions d'éclairement : continu et alterné (16/8).

Quelles que soient les conditions de culture utilisées, la croissance au cours du temps de *C. calcitrans* présente une allure exponentielle classique (Figures 18 et 19). En milieu G+, le plateau de saturation est observé dès le 3ème ou le 4ème jour de culture cependant qu'en milieu f/2, nettement plus riche en sels nutritifs, la croissance se poursuit jusqu'au 7ème j, permettant l'obtention de densités cellulaires nettement plus élevées. En effet, à 7 j de culture, les densités cellulaires, en lumière continue et alternée, sont respectivement 15 et 25 fois plus élevées qu'en milieu G+.

2.1.1. Cinétique en lumière continue

L'addition d'époxiconazole au milieu de culture, en lumière continue, induit une inhibition immédiate de la croissance, qui va croissant avec la concentration en fongicide (Figure 18 A et B). Cette inhibition s'avère nettement plus marquée lorsque l'algue est cultivée en milieu G+ ; ainsi, après 3 j de culture en présence de 2,3 µg d'époxiconazole /L, l'inhibition de la densité cellulaire, de 62 % en milieu f/2 (Figure 18 A) s'élève à 76 % en milieu G+ (Figure 18 B). L'effet inhibiteur s'atténue au cours du temps mais demeure important après 7 j de culture ; en effet, en présence de 2,3 µg/L d'époxiconazole, des inhibitions de la densité cellulaire de 27 % et 50 % sont respectivement observées en milieu f/2 et en milieu G+.

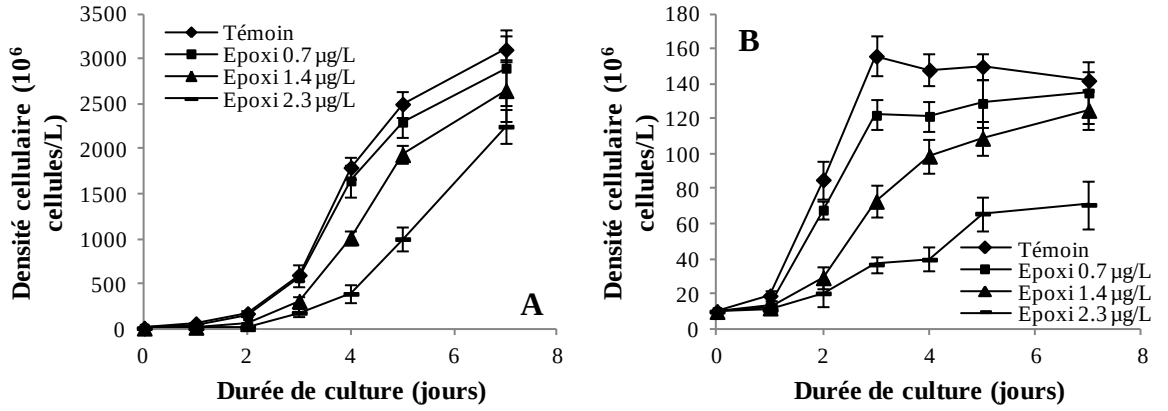


Figure 18 A, B : *Effet de l'époxiconazole (Opus), ajouté à différentes concentrations dans le milieu de culture, sur la croissance de C. calcitrans, cultivée en lumière continue. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. A) milieu f/2 ; B) milieu G+.*

2.1.2. Cinétique en lumière alternée

En lumière alternée (16 h d'éclairement / 8 h d'obscurité), la présence d'époxiconazole dans le milieu de culture induit également une inhibition immédiate de la croissance, fonction de la concentration en fongicide. L'inhibition se révèle plus marquée qu'en lumière continue. Ainsi à 3 j de culture, en présence de 2,3 µg/L d'époxiconazole, les densités cellulaires sont réduites de 80 % et 91 % respectivement en milieux f/2 (Figure 19A) et G+ (Figure 19B). A partir du 4ème j de culture, l'inhibition s'atténue progressivement et, après 7 j, une levée totale de l'inhibition est observée en milieu G+ cependant qu'en milieu f/2, subsiste une inhibition de 48 % (Figure 19A).

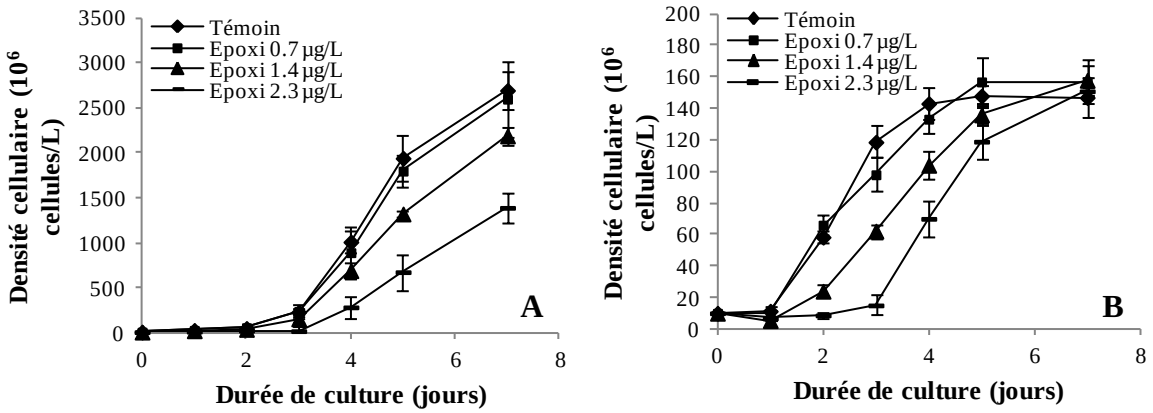


***Figure 19 A, B** : Influence de l'époxiconazole (Opus), présent à différentes concentrations dans le milieu de culture, sur la croissance de C. calcitrans, cultivée en lumière alternée. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. **A)** milieu f/2 ; **B)** milieu G+.*

L'influence positive de la lumière et des sels nutritifs sur la croissance est confirmée par les données du tableau 8. Le taux de croissance, déterminé à 3 j de culture, s'avère être le plus élevé en milieu f/2 et en lumière continue (0,065/h) et le plus faible est observé en milieu G+ et en lumière alternée (0,011/h).

Tableau 8 : Taux de croissance (µ) de *C. calcitrans* mesuré après trois jours de culture dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue ou alternée. Résultats exprimés en µ/h ± ES.

Lumière	Continue	Alternée
Milieu f/2	0,065 ± 0,0012	0,045 ± 0,011
Milieu G+	0,037 ± 0,0049	0,011 ± 0,0008

2.3. Détermination de la CE_{50}

La détermination de la CE_{50} selon la norme ISO 10253 (AFNOR, 1998), faite après 3 j de culture, montre que les deux facteurs qui influencent positivement le taux de croissance, à savoir la richesse du milieu en sels nutritifs et la lumière, diminuent la sensibilité de l'algue à l'époxiconazole. En effet, la valeur de la CE_{50} la plus élevée de 4,47 µg/L est obtenue en milieu f/2 et en lumière continue et la valeur de CE_{50} la plus faible, de 2,63 µg/L, est observée en milieu G+ et en lumière alternée (Tableau 9). Des valeurs intermédiaires sont constatées en lumière alternée et milieu f/2 (3,38 µg/L) et en lumière continue et milieu G+ (2,9 µg/L).

Tableau 9 : CE_{50} de l'époxiconazole (Opus) mesurée après 3 jours de culture de *C. calcitrans* dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue et alternée. Résultats exprimés en µg/L d'époxiconazole ± ES.

	Milieu f/2	**Milieu G+**
Lumière continue	4,47 ± 0,4	2,9 ± 0,24
Photopériode de 16 h	3,38 ± 0,29	2,63 ± 0,29

On remarque ainsi que l'algue est plus sensible à l'action du fongicide lorsqu'elle est cultivée dans un milieu pauvre en nitrates (G+), avec une photopériode de 16 h. On peut déduire qu'en milieu moins riche avec une durée d'éclairement moins longue, les effets toxiques du fongicide sur *C. calcitrans* peuvent être plus élevés.

2.4. Effet sur la teneur en pigments

2.4.1. Milieu f/2, lumière continue

L'effet de l'époxiconazole (1,4 µg/L) a été déterminé sur l'évolution de la teneur en pigments au cours de la culture de *C. calcitrans*. En milieu f/2 et en lumière continue, les teneurs des trois pigments, initialement de 228 (chlorophylle a), 142 (chlorophylle c) et 90 ng (caroténoïdes) / million de cellules (caroténoïdes), ne sont pas significativement affectées par la présence du fongicide au cours du temps (Figure 20). Que le fongicide soit présent ou non, on observe une diminution significative de la chlorophylle c et des caroténoïdes à deux jours de culture suivie d'un retour aux valeurs initiales à trois jours, valeurs qui ensuite diminuent légèrement.

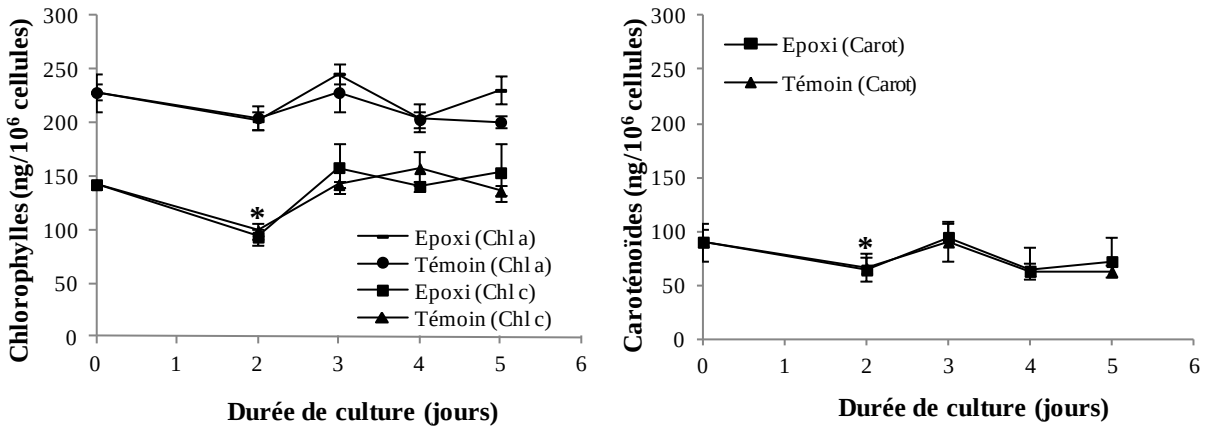


***Figure 20**: Teneur en pigments de C. calcitrans cultivée en milieu f/2 et lumière continue en présence de 1,4 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. L'astérisque désigne une différence significative par rapport à T_0 au seuil de 5 %.*

2.4.2. Milieu G+, lumière continue

Lorsque les algues sont cultivées en milieu G+ et en lumière continue, la teneur en pigments du témoin évolue peu au cours des 4 j de culture (Figure 21 A, B, C). On observe toutefois une légère augmentation de la teneur en chlorophylle a, à 2 j de culture, suivie à 3 j d'un retour à la valeur initiale.

L'addition d'époxiconazole (1,4 µg/L) au milieu induit à 2 j une forte augmentation de la teneur des trois pigments ; en effet, la teneur en chlorophylle a, initialement de 43 ng/10^6 cellules s'élève à 158 ng/10^6 cellules (Figure 21A) cependant que la chlorophylle c, passe de 19 à 61 ng/10^6 cellules (Figure 21B). Parallèlement, la teneur en caroténoïdes est également augmentée entre T_0 et 2 j de culture, évoluant de 36 à 85 ng/10^6 cellules (Figure 21C). Ces stimulations de la teneur des trois pigments s'atténuent à 3 j pour ensuite disparaître à 4 j de culture.

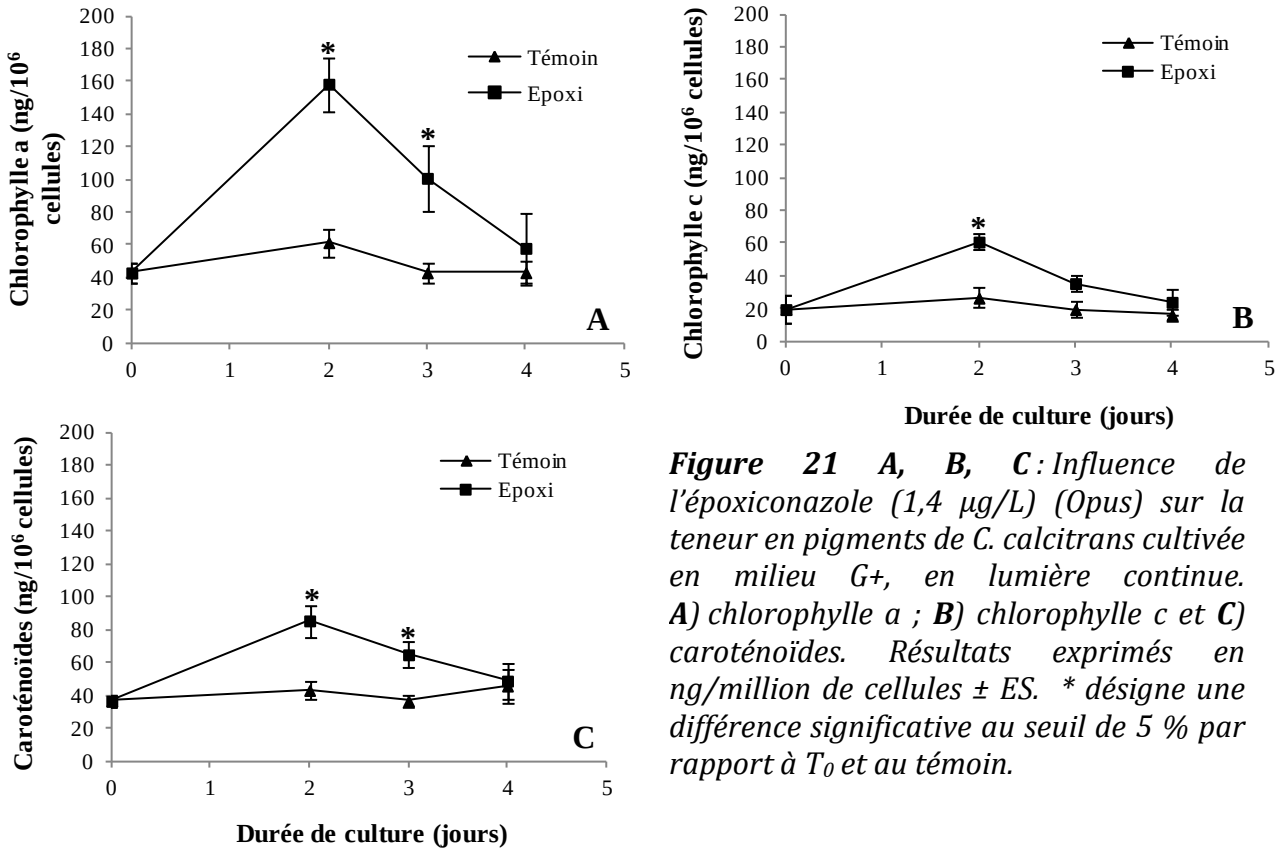


***Figure 21 A, B, C** : Influence de l'époxiconazole (1,4 µg/L) (Opus) sur la teneur en pigments de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière continue. **A**) chlorophylle a ; **B**) chlorophylle c et **C**) caroténoïdes. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à T_0 et au témoin.*

Il est à noter que la culture en milieu G+ se traduit par des teneurs en pigments nettement plus faibles qu'en milieu f/2, à savoir de 4 à 6 fois moindres pour les chlorophylles et 2 fois plus faibles pour les caroténoïdes (Figures 20 et 21).

2.4.3. Milieu G+, lumière alternée

Lorsque *C. calcitrans* est cultivée en milieu G+ et en lumière alternée, sa teneur en pigments montre peu de variations au cours des 5 j de culture et s'avère du même ordre de grandeur que celle enregistrée en milieu G+ et en lumière continue (Figure 22).

La présence d'époxiconazole à la concentration de 1,4 µg/L produit, à 3 j de culture, une forte augmentation des teneurs en chlorophylle a (Figure 22A), chlorophylle c (Figure 22B) et caroténoïdes (Figure 22C) qui sont respectivement accrues de 202 %, 214 % et 70 %. Ces stimulations s'atténuent ensuite à 4 j pour disparaître au 5ème j de culture.

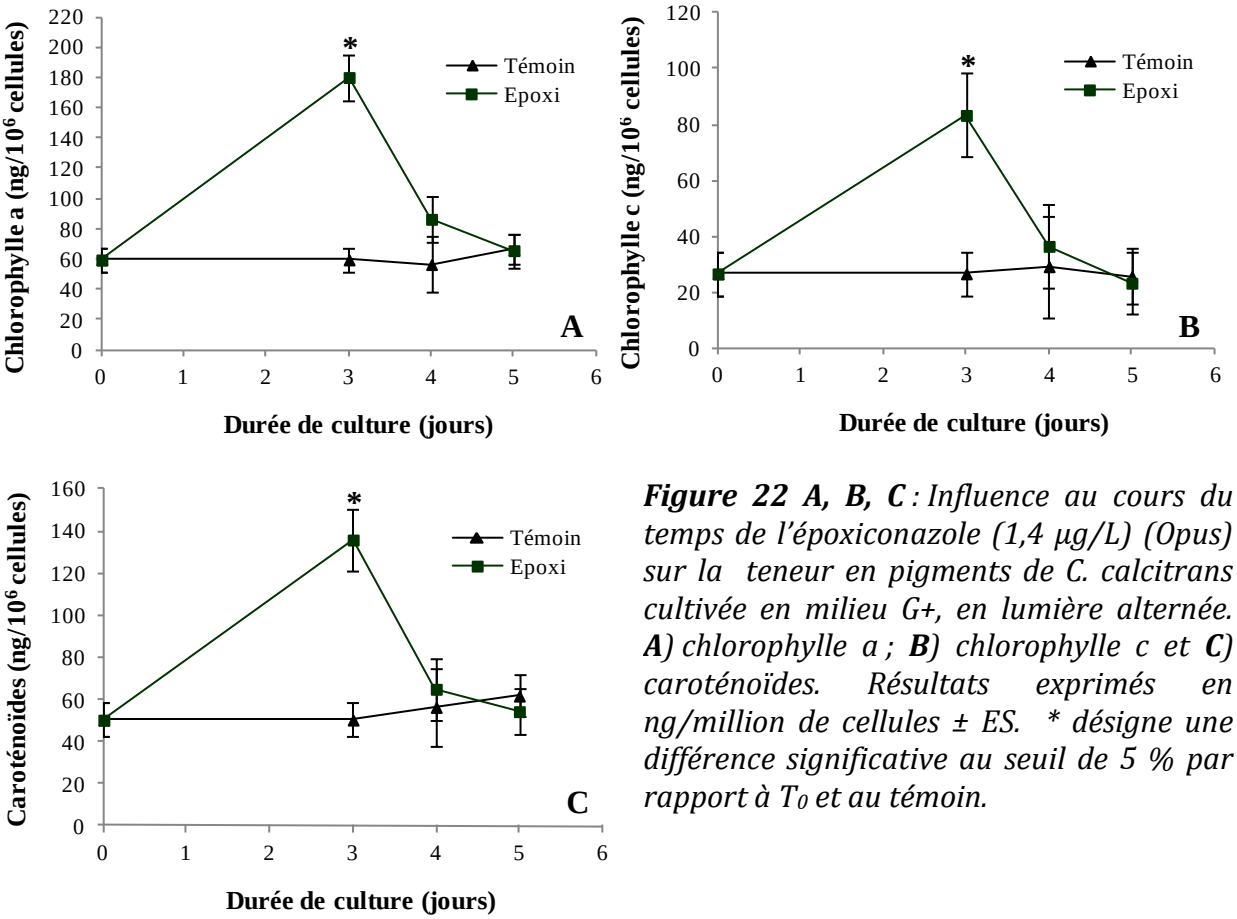


***Figure 22 A, B, C** : Influence au cours du temps de l'époxiconazole (1,4 µg/L) (Opus) sur la teneur en pigments de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière alternée. **A**) chlorophylle a ; **B**) chlorophylle c et **C**) caroténoïdes. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à T_0 et au témoin.*

2.5. Effet sur la teneur en ATP

L'effet de l'époxiconazole a été suivi sur l'évolution de la teneur en ATP de *C. calcitrans* cultivée dans les deux milieux de culture f/2 et G+ et sous deux conditions d'éclairement : lumière continue et alternée.

Que ce soit en lumière continue ou en lumière alternée, le témoin montre le même type d'évolution de la teneur en ATP. Ainsi, après une augmentation, maximale après 1 j de culture en milieu G+ (Figures 23B et 24B) ou après 2 j en milieu f/2 (Figures 23A et 24A), on observe une diminution de la teneur en ATP.

2.5.1. Lumière continue

La figure 23 montre que, en lumière continue, pour les deux milieux de culture utilisés, la présence de l'époxiconazole induit une augmentation de la teneur en ATP qui est fonction de la concentration en fongicide ; la stimulation, maximale à 1-2 j de culture

diminue ensuite progressivement. Ainsi, en présence d'une concentration en époxiconazole de 1,4 µg/L, la teneur en ATP est augmentée de 62 % après 1 j en milieu f/2 (Figure 23A) et de 182 % après 2 j de culture en milieu G+ (Figure 23B) ; cette stimulation s'atténue ensuite progressivement, pour disparaître totalement à 4 j. Cependant, à la concentration de 2,3 µg/L en époxiconazole, l'action stimulatrice subsiste même après 4 j de culture étant de 70 % en milieu G+ (Figure 23B) et de 38 % en milieu f/2 (Figure 23A).

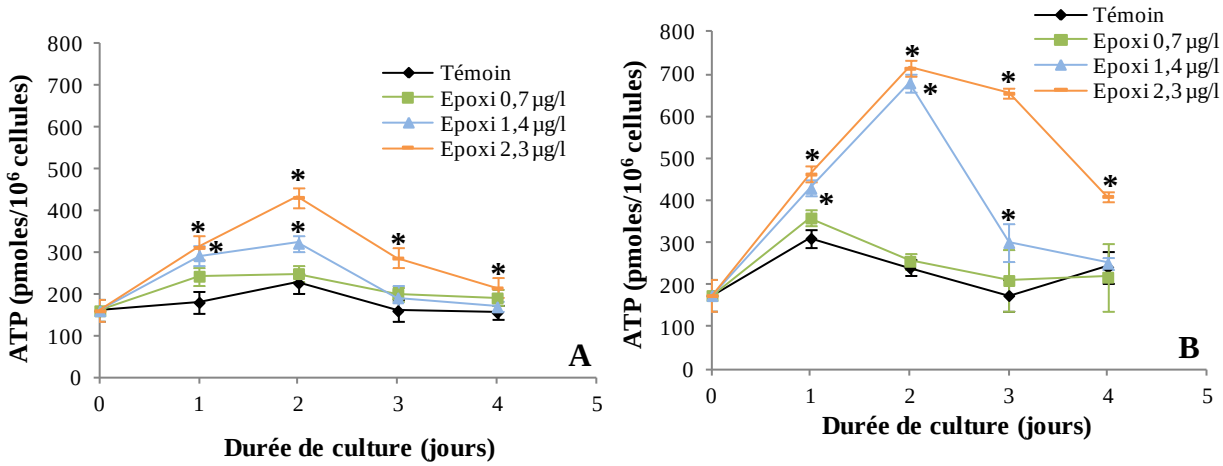


***Figure 23 A, B** : Influence au cours du temps de l'époxiconazole (Opus) sur la teneur en ATP de C. calcitrans cultivée en lumière continue : **A**) milieu f/2 ; **B**) milieu G+. Résultats exprimés en pmoles/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

En lumière alternée, l'époxiconazole présent dans le milieu de culture, produit une augmentation de la teneur en ATP, maximale à 2 j de culture en milieu f/2 (Figure 24A) et à 1 j de culture en milieu G+ (Figure 24B), augmentation qui disparaît ensuite progressivement avec l'avancée en âge de la culture. La stimulation observée est fonction de la concentration en fongicide. Ainsi, avec des concentrations en époxiconazole de 1,4 et 2,3 µg/L, les teneurs en ATP sont respectivement augmentées de 62 et 115 % après 2 j de culture en milieu f/2 (Figure 24A) et de 53 et 94 % après 1 j de culture en milieu G+ (Figure 24B).

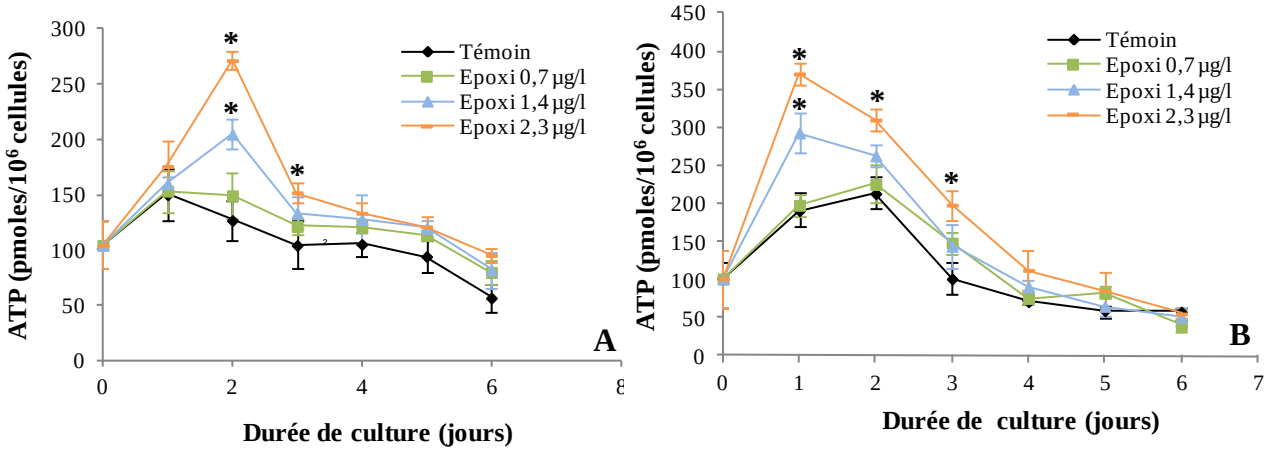


Figure 24 A, B : *Evolution au cours du temps de la teneur en ATP de C. calcitrans, cultivée en lumière alternée en présence d'époxiconazole (Opus).* ***A****) milieu f/2 ;* ***B****) milieu G+. Résultats exprimés en pmoles/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

2.6. Effet sur la photosynthèse et la respiration

2.6.1. Action aiguë

En action aiguë, l'époxiconazole produit, à la concentration de 0,45 µg/L, une stimulation légère mais significative de la vitesse de respiration et de photosynthèse lorsque la culture de *C. calcitrans* est âgée de 3 j (Tableau 10) ; cet effet disparaît ensuite avec l'avancée en âge de la culture.

A partir d'une concentration en époxiconazole de 0,9 µg/L, une inhibition de la vitesse de la photosynthèse est observée, qui va croissant avec la concentration en fongicide et cet effet est d'autant plus important que la culture est jeune ; ainsi, l'addition de 3,6 µg/L produit une inhibition de la photosynthèse qui, de 62 % chez des cultures de 3 j, n'est plus que de 14 % chez des cultures de 7 j. Parallèlement, l'époxiconazole, aux concentrations de 1,8 et 3,6 µg/l, induit des inhibitions significatives de la respiration, respectivement de 31 et 50 %, chez des cultures âgées de 3 j. Chez des cultures âgées de 4 j, l'addition d'époxiconazole à la concentration de 3,6 µg/L est nécessaire pour produire une inhibition de 20 % de la respiration, inhibition qui s'atténue ensuite avec l'âge de la culture.

Tableau 10 : Action aiguë de l'époxiconazole (Opus) sur la vitesse de respiration et de photosynthèse, en fonction de l'âge de la culture de *C. calcitrans* (milieu f/2 ; lumière continue). Vitesses mesurées après 1 h d'action, exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES. Entre parenthèses : % par apport au témoin.

Jours	*C. calcitrans* (10^6 cellules /L)		Epoxiconazole (µg/L)				
			0	0,45	0,9	1,8	3,6
3 j	884	Phot	3,00 ± 0,15	3,60 ± 0,13 (120 %)	1,99 ± 0,11 (66 %)	1,44 ± 0,12 (48 %)	1,14 ± 0,15 (38 %)
		Resp	1,28 ± 0,11	1,64±0,08 (127 %)	1,27±0,17 (99 %)	0,89 ± 0,13 (69 %)	0,64 ± 0,09 (50 %)
4 j	1420	Phot	2,36 ± 0,19	2,59 ± 0,11 (110 %)	1,93 ± 0,09 (82 %)	1,84 ± 0,14 (78 %)	1,44 ± 0,16 (61 %)
		Resp	1,25 ± 0,08	1,26 ± 0,13 (100 %)	1,23 ± 0,12 (98 %)	1,30 ± 0,11 (104 %)	1,00 ± 0,08 (80 %)
5 j	2407	Phot	1,21 ± 0,12	1,24 ± 0,13 (102 %)	1,18 ± 0,12 (97 %)	0,97 ± 0,04 (80 %)	0,71 ± 0,09 (59 %)
		Resp	0,75 ± 0,03	0,71 ± 0,05 (94 %)	0,86 ± 0,09 (114 %)	0,68 ± 0,09 (90 %)	0,63 ± 0,08 (84 %)
6 j	2914	Phot	1,09 ± 0,10	1,03 ± 0,11 (95 %)	1,09 ± 0,10 (100 %)	0,84 ± 0,12 (77 %)	0,64 ± 0,09 (59%)
		Resp	0,61 ± 0,05	0,67 ± 0,02 (110 %)	0,57 ± 0,07 (94 %)	0,62 ± 0,10 (102 %)	0,55 ± 0,12 (90%)
7 j	3017	Phot	1,18 ± 0,11	1,32 ± 0,12 (112 %)	1,24 ± 0,09 (105 %)	1,08 ± 0,13 (91 %)	1,02 ± 0,11 (86 %)
		Resp	0,71 ± 0,08	0,76 ± 0,09 (107 %)	0,79 ± 0,11 (110 %)	0,67 ± 0,11 (94 %)	0,75 ± 0,13 (105 %)

2.6.2. Action chronique

2.6.2.1. Milieu G+

Les données du tableau 11 montrent l'évolution au cours du temps des vitesses de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans*, cultivée dans le milieu G+, en présence ou non de différentes concentrations d'époxiconazole (Opus).

Chez le témoin, les vitesses de photosynthèse et de respiration, respectivement de 8,15 et 6,9 μLO_2/h/million de cellules à 2 j de culture, diminuent fortement au 3ème j, chutant

à des valeurs de 2,6 et 1,47 μLO_2/h/million de cellules (Tableau 11). Cet abaissement se poursuit au 4ème j mais de façon moindre puisque les vitesses sont alors de 1,56 et 1,08 μLO_2/h/million de cellules.

Tableau 11 : Influence de l'époxiconazole (Opus), présent à différent concentrations dans le milieu de culture, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans* mesurée après 2, 3 et 4 jours de culture en milieu G+ et lumière continue. Vitesses exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin.

Jours		Epoxiconazole (µg/L)				
		0	**1,08**	**2,16**	**2,88**	**3,6**
2 j	**Phot**	8,15 ± 1,98	5,75 ± 1,05 (71 %)	19,57 ± 2,45 (240%)	23,16 ± 2,11 (284 %)	27,49 ± 1,36 (337%)
	Resp	6,90 ± 1,45	8,62 ± 2,45 (125 %)	29,12 ± 2,01 (422 %)	32,33 ± 2,33 (468 %)	38,48 ± 2,66 (558 %)
3 j	**Phot**	2,60 ± 0,97	2,89 ± 1,09 (111 %)	6,61 ± 1,77 (255 %)	8,18 ± 2,38 (315 %)	18,72 ± 2,85 (721 %)
	Resp	1,47 ± 0,15	1,49 ± 0,25 (101 %)	5,87 ± 0,65 (399 %)	8,18 ± 1,61 (555 %)	10,89 ± 1,88 (739 %)
4 j	**Phot**	1,56 ± 0,19	2,11 ± 0,17 (135 %)	2,33 ± 0,21 (150 %)	2,99 ± 1,01 (192 %)	6,75 ± 1,11 (434 %)
	Resp	1,08 ± 0,09	1,24 ± 0,15 (114 %)	2,48 ± 0,98 (229 %)	2,10 ± 1,12 (194 %)	6,75 ± 1,26 (624 %)

La présence dans le milieu de culture d'époxiconazole, à la concentration de 1,08 µg/L, produit, à l'exception d'une inhibition de 29 % de la photosynthèse observée à 2 j, une légère stimulation voire peu d'effet des échanges gazeux. A partir de la concentration de 2,16 µg/L, l'époxiconazole induit une augmentation des vitesses de photosynthèse et de respiration, qui va croissant avec la concentration en fongicide et cet effet est observé quel que soit l'âge de la culture. Ainsi, à la concentration de 3,6 µg/L, l'époxiconazole produit une stimulation des vitesses qui, pour la photosynthèse, varie de + 237 à + 621 % et, pour la respiration, de + 458 à 639 % ; l'effet étant maximal au 3ème j de culture.

2.6.2.2. Milieu f/2

Le tableau 12 présente l'évolution des vitesses des échanges gazeux de *C. calcitrans*, cultivée en milieu f/2, en présence ou non d'époxiconazole (Opus), à différentes concentrations.

Tableau 12 : Influence de l'époxiconazole (Opus), présent à différentes concentrations dans le milieu de culture sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans*, mesurée après 2, 3 et 4 jours de culture en milieu f/2 et lumière continue. Vitesses exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES. Entre parenthèses : % par apport au témoin.

		Epoxiconazole (µg/L)				
Jours		**0**	**1,08**	**2,16**	**2,88**	**3,6**
2 j	**Phot**	12,21±1,88	2,53 ± 0,16 (21 %)	5,28 ± 1,08 (43 %)	7,76 ± 1,98 (64 %)	10,27 ± 1,76 (84 %)
	Resp	2,33 ± 0,19	1,54 ± 0,28 (66 %)	2,36 ± 0,23 (101 %)	5,14 ± 1,33 (220 %)	7,76 ± 1,18 (333 %)
3 j	**Phot**	3,11 ± 0,28	3,17 ± 0,37 (102 %)	3,46 ± 0,12 (111 %)	4,76 ± 0,81 (153 %)	8,72 ± 1,22 (280 %)
	Resp	1,70 ± 0,09	1,56 ± 0,43 (92 %)	1,75 ± 0,08 (103%)	1,70 ± 0,18 (100 %)	3,41 ± 0,28 (201 %)
4 j	**Phot**	1,60 ± 0,11	1,63 ± 0,18 (102 %)	1,62 ± 0,18 (101 %)	2,68 ± 0,23 (167 %)	5,29 ± 1,21 (330 %)
	Resp	0,66 ± 0,16	0,67 ± 0,11 (102 %)	0,69 ± 0,11 (106 %)	0,78 ± 0,07 (119 %)	2,22 ± 0,19 (339 %)

Comme en milieu G+, les vitesses de photosynthèse et de respiration du témoin, élevées à 2 j de culture chutent brutalement à 3 j pour diminuer encore mais de façon plus atténuée à 4 j de culture. Il est à noter que les vitesses de photosynthèse sont, à 2 j de culture, nettement plus élevées que celles observées dans le milieu G+, plus pauvre en nitrates et phosphate ; par la suite, peu de différences apparaissent entre les vitesses d'échanges gazeux obtenues dans les deux milieux.

La présence d'époxiconazole durant 2 j dans le milieu de culture produit, dès la concentration de 1,08 µg/L, une inhibition de la vitesse de photosynthèse qui s'atténue lorsque la concentration en fongicide augmente. Parallèlement, la vitesse de respiration,

inhibée en présence de 1,08 µg/L d'époxiconazole, devient fortement stimulée quand la concentration en époxiconazole s'élève à 2,88 et 3,6 µg/L, avec des stimulations respectivement de + 120 et + 233 %.

Lorsque la culture atteint 3 et 4 j de culture, l'époxiconazole, aux concentrations de 1,08 et 2,16 µg/L, ne produit aucun effet sur les échanges gazeux. En revanche, aux concentrations de 2,88 et 3,6 µg/L, une nette stimulation de la photosynthèse est observée comme à 2 j de culture, accompagnée d'une forte stimulation de la respiration en présence de 3,6 µg/L d'époxiconazole.

Complémentairement, une mesure des échanges gazeux a été réalisée après 3 j de culture en présence de la molécule pure d'époxiconazole (2 mg/L) qui produit une réduction de la densité cellulaire de 61 %. Les données du tableau 13 confirment la stimulation de la respiration (+ 75 %) observée sous l'effet du fongicide (Opus) aux concentrations de 2,88 et 3,6 µg/L mais, en revanche, met en évidence une inhibition de la photosynthèse de 36 %. La mesure de l'efficacité photochimique confirme cet effet inhibiteur de l'époxiconazole.

Tableau 13 : Influence de l'époxiconazole (2 mg/L), présent dans le milieu de culture, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans* mesurée après 3 jours de culture en milieu f/2 et lumière continue. Vitesses exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin.

	Témoin	Epoxiconazole
Respiration	1,39 ± 0,14	2,43 ± 0,16 (175 %)
Photosynthèse	3,82 ± 0,29	2,44 ± 0,19 (64 %)
% d'inhibition de l'efficacité Photochimique		81 %

2.7. Effet sur le volume cellulaire

La présence de 2,88 µg/L d'époxiconazole dans le milieu de culture produit un accroissement significatif du volume des cellules, avec 70 % d'augmentation dès le 2ème j ; cet effet du fongicide se maintient pendant le 3ème et le 4ème j et disparaît ensuite au 5ème j (Figure 25). Il est à noter que le volume des cellules de la culture témoin montre

peu de variation au cours des 6 j de culture, à l'exception toutefois d'une légère diminution au 2ème j.

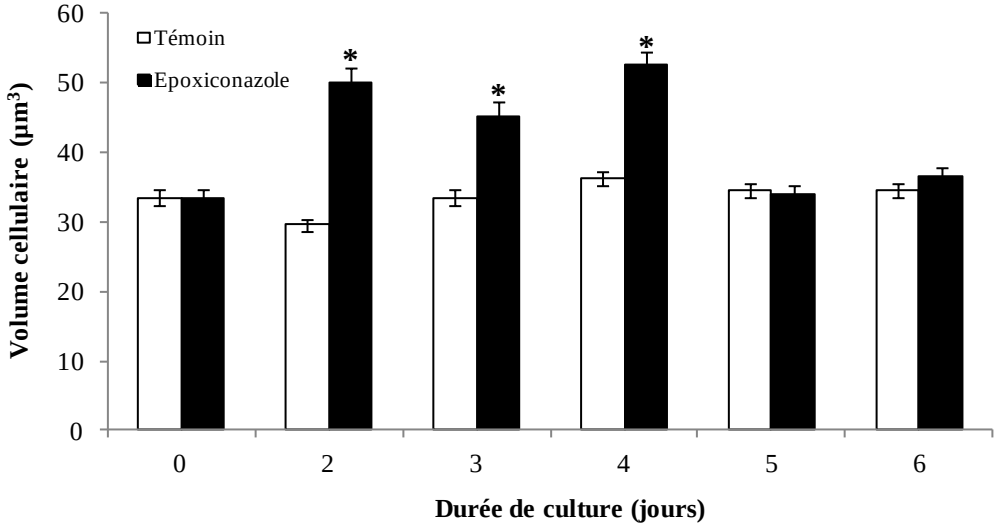


Figure 25 : *Volume cellulaire de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière continue en présence de 2,88 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en µm³ ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

3. Action de l'époxiconazole (Opus) ajouté à différents stades de croissance

3.1. Effet sur la croissance

L'influence du stade physiologique de croissance de *C. calcitrans* dans sa réponse à l'époxiconazole (Opus) (2,16 µg/L) a été étudiée sous deux conditions d'éclairement : lumière continue et lumière alternée.

3.1.1. Lumière continue

En lumière continue, que le fongicide soit ajouté initialement (T_0) ou après 1 j de culture (T_1), l'inhibition produite sur la division cellulaire s'avère équivalente à 2 et 3 j de culture étant de 60% à 3 j. L'inhibition s'atténue ensuite, se réalisant plus rapidement après une addition du fongicide à 1 j qu'à T_0, pour n'être plus dans les deux cas, que de 20 % après 5 j de culture (Figure 26).

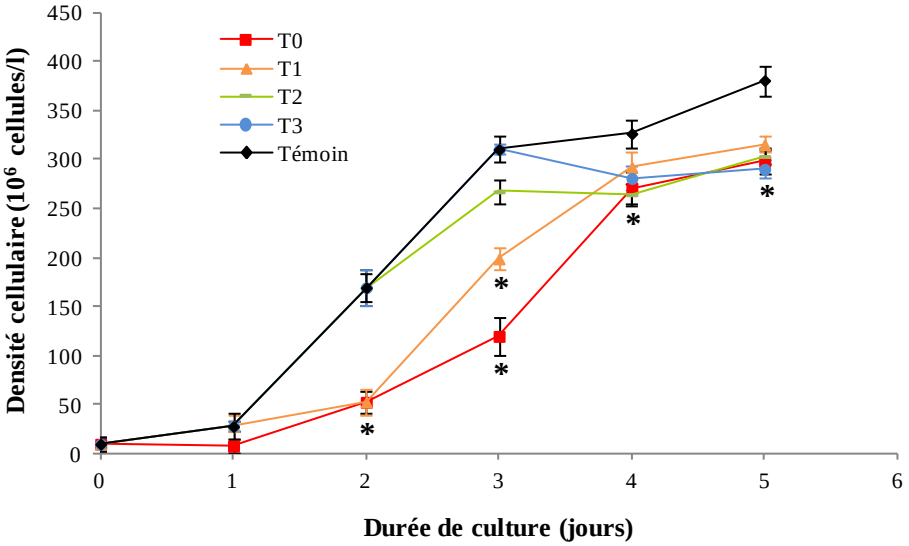


Figure 26 : *Effet au cours du temps de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), ajouté à différents stades physiologiques (à 0, 1, 2 ou 3 jours), sur la croissance de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

L'addition d'époxiconazole (Opus) après 2 ou 3 j de culture (T_2, T_3) produit, 24 h plus tard, des inhibitions de la division cellulaire de 14 % et, la densité cellulaire ainsi établie, demeure quasiment inchangée, même après 6 j de culture.

Il apparaît en fait que, quel que soit le stade de culture où l'époxiconazole est ajouté, la densité cellulaire observée à 6 j de culture se révèle être du même ordre de grandeur, représentant une inhibition résiduelle de 20 %.

3.1.2. Lumière alternée

En lumière alternée, la figure 27 montre que l'ajout d'époxiconazole à T_0 produit une inhibition de 73-76 % de la croissance qui se maintient jusqu'à 3 - 4 j de culture puis s'atténue ensuite progressivement. À 6 j de culture, seule une inhibition de 14 % est encore observée.

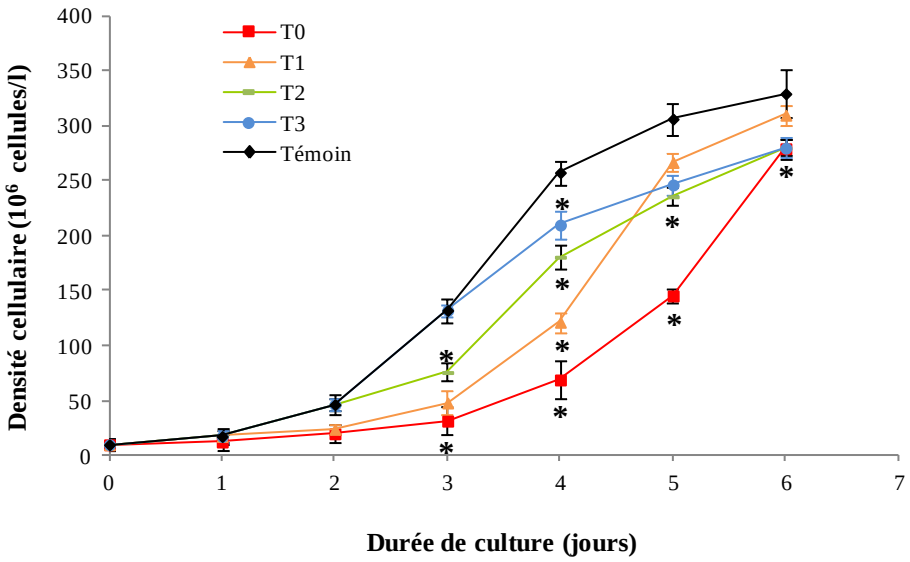


Figure 27 : *Effet au cours du temps de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), ajouté à différents stades physiologiques (à 0, 1, 2 ou 3 jours), sur la croissance de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière alternée. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

Si le fongicide est ajouté après 1 j de culture (T_1), il s'en suit une réduction de la croissance, légèrement moindre que lors de l'exposition au fongicide dès le début de la culture et la levée de l'inhibition se réalise plus rapidement. L'ajout d'époxiconazole après 2 ou 3 j de culture (T_2, T_3) produit une inhibition de la densité cellulaire de moindre importance, bien qu'évidente après 24 h d'action (43 % à 3 j de culture pour T_2 et 18 % à 4 j de culture pour T_3). Quel que soit le stade physiologique où le fongicide est ajouté, une inhibition résiduelle de 8 - 15 % subsiste à 6 j de culture.

3.2. Effet sur les échanges gazeux

L'évolution des échanges gazeux de *C. calcitrans* en milieu G+ et en lumière continue montre que les vitesses de la photosynthèse et de la respiration marquent une augmentation à 2 j de culture puis diminuent progressivement au cours du temps.

L'addition à T_0 d'époxiconazole (2,16 µg/L) produit après 2 j de culture une augmentation de la vitesse de photosynthèse de 25 % qui s'élève à 90 % au 4ème j (Figure 28A). Parallèlement, le fongicide induit dès le 2ème j de culture, une stimulation de la vitesse de respiration de 140 % qui s'atténue ensuite et s'établit à 48 % à 4 j de culture.

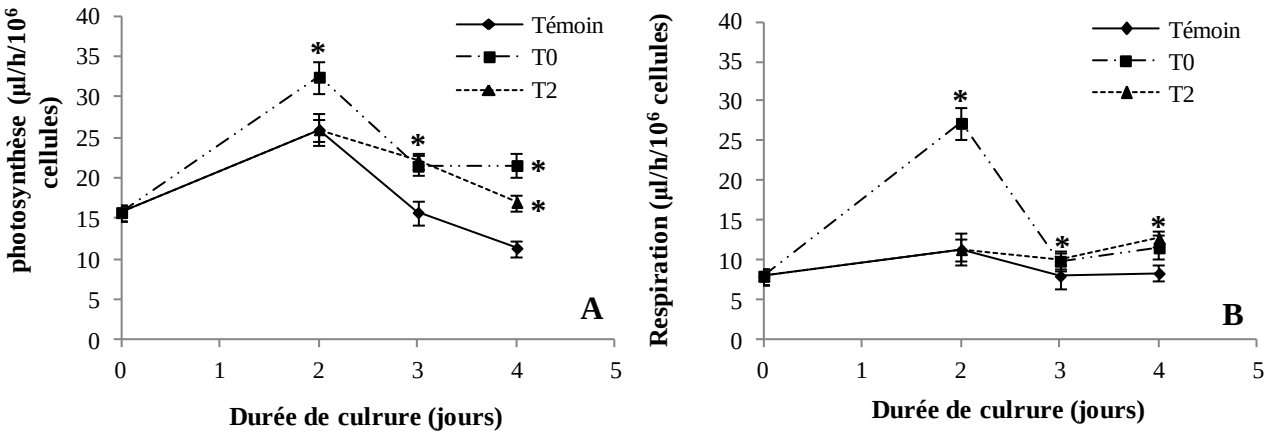


Figure 28 A, B : *Effet au cours du temps de 2,16 µg/l d'époxiconazole (Opus) ajouté à différents stades physiologiques sur les échanges gazeux : photosynthèse (**A**) et respiration (**B**) chez C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue. Vitesses exprimées en µLO_2/h/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

Lorsque l'époxiconazole est ajouté après 2 j de culture, il induit une augmentation de la vitesse de photosynthèse de 40 et 50 % respectivement à 3 et 4 j de culture, accompagnée d'une augmentation de la respiration de 25 % à 3 j et de 50 % à 4 j de culture (Figure 28B).

3.3. Effet sur la teneur en pigments

L'influence de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus) sur la teneur en pigments a été effectuée après apport du fongicide à différents moments de la culture. La mesure a été réalisée après 3 j de culture en lumière continue (Tableau 13) mais après 4 j en lumière alternée, afin de disposer d'une quantité suffisante de cellules pour le dosage des pigments (Tableau 14).

3.3.1. Lumière continue

Les résultats du tableau 14 montrent que l'ajout d'époxiconazole un jour après le début de la culture, induit à 3 j, une augmentation de la teneur des 3 pigments qui se révèle, pour les chlorophylles, plus faible qu'avec une addition du fongicide au démarrage de la culture (T_0). Ajouté après 2 j de culture, le fongicide ne modifie pas significativement, comparativement au témoin, la teneur des pigments évaluée 24 h plus tard.

Tableau 14 : Effet de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), ajouté à différents moments de la culture, sur la teneur en pigments de *C. calcitrans*, mesurée après 3 jours de culture en milieu G+, en lumière continue. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES et en % par rapport aux témoins.

	Chlorophylle a	Chlorophylle c	Caroténoïdes
Témoin	70,8 ± 8,67	25,06 ± 5,42	53,15 ± 3,08
+ Epoxi. à T_0	93,3 ± 9,21 (132 %)	35,3 ± 3,81 (141 %)	59,4 ± 4,32 (112 %)
+ Epoxi. à t 1 j	85,2 ± 6,43 (120 %)	30,9 ± 3,54 (123 %)	60,2 ± 4,87 (113 %)
+ Epoxi. à t 2 j	74,4 ± 7,62 (105 %)	27,6 ± 4,22 (110 %)	57,7 ± 3,90 (108 %)

Quel que soit le moment d'addition du fongicide à la culture, le rapport chlorophylle a / chlorophylle c, s'avère peu modifié, s'établissant sous l'effet de l'époxiconazole entre 2,64 et 2,76, comparativement à une valeur de 2,83 trouvée chez le témoin.

3.3.2. Lumière alternée

Afin de disposer d'une quantité suffisante de cellules, la mesure de la teneur en pigments a été réalisée après 4 j de culture, quand l'effet inhibiteur de l'époxiconazole (Opus) sur la croissance s'avère encore important (cf Figure 18B).

Tableau 15 : Effet de l'addition de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), à différents moments de la culture, sur la teneur en pigments de *C. calcitrans* mesurée après 4 jours de culture en milieu G+, en lumière alternée. Résultats exprimés en ng/million de cellules et en % par rapport aux témoins.

	Chlorophylle a	Chlorophylle c	Caroténoïdes
Témoin	108 ± 11,23	42 ± 3,22	106 ± 9,14
+ Epoxi . à T_0	323 ± 13,6 (300 %)	116 ± 20,6 (276 %)	247 ± 26,8 (232 %)
+ Epoxi. à 1 j	246 ± 21,1 (228 %)	90,7 ± 9,03 (214 %)	170 ± 18,4 (160 %)
+ Epoxi. à 2 j	208 ± 27,3 (193 %)	73,4 ± 5,69 (173 %)	153 ± 12,5 (144 %)

Le tableau 15 montre que l'ajout de 2,16 µg/L d'époxiconazole à T_0 produit une augmentation importante de la teneur en chlorophylles a (+ 200 %) et c (+ 176 %) et en caroténoïdes (+ 132 %). Cette augmentation de la teneur en pigments, bien qu'atténuée par l'addition du fongicide après 1 j de culture et plus encore après 2 j de culture, reste

cependant très élevée avec + 93 %, + 73 % et + 44 % respectivement pour les chlorophylles a, c et caroténoïdes.

3.4. Effet sur la teneur en ATP

Compte tenu de la stimulation par le fongicide des processus fournisseurs d'énergie, à savoir respiration et photosynthèse, il était intéressant de mesurer la teneur en ATP.

Chez le témoin, on observe dès 1 j de culture une forte augmentation de la teneur en ATP qui ensuite diminue progressivement (Figure 29). L'addition de 2,16 µg/L d'époxiconazole au début de la culture (T_0), en maintenant la teneur en ATP élevée pendant 2 j, retarde de ce fait la diminution de la teneur en ATP, teneur qui reste très supérieure à celle du témoin même après 6 j de culture (+ 81 %).

L'ajout du fongicide à 1 j de culture produit 48 h plus tard, une forte augmentation de la teneur en ATP (+ 109 %), teneur qui diminue ensuite progressivement mais reste encore à 4 j supérieure à celle du témoin (+ 93 %). Au 5ème j, la stimulation disparaît et la teneur en ATP devient équivalente à celle du témoin. L'ajout d'époxiconazole à 2 ou à 3 j de culture induit, 24 h plus tard, des augmentations équivalentes de la teneur en ATP (+ 37% et + 35%), augmentations qui disparaissent ensuite à 5 et 6 j, la teneur en ATP rejoignant celle du témoin.

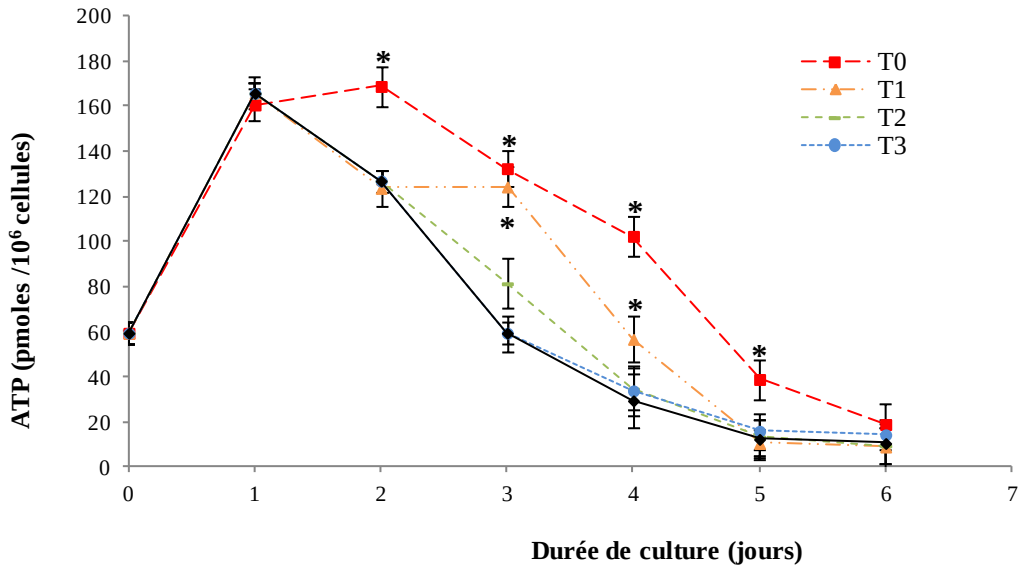


Figure 29 : *Effet de l'addition de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), à différents moments de la culture, sur l'évolution au cours du temps de la teneur en ATP de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue. Résultats exprimés en picomoles/million de cellules ± ES. L'astérisque désigne une différence significative par rapport au témoin au seuil de 5 %.*

II. Etude de l'effet du nonylphénol

1. Comparaison de l'effet du nonylphénol sur la croissance de trois microalgues

La mesure de la croissance a été effectuée après 3 j de culture en présence de différentes concentrations en nonylphénol et les valeurs des CSEO et des CE_{50} sont rapportées dans le tableau 16. Il apparaît d'une part, que la culture en milieu f/2 conduit à des valeurs de CSEO et de CE_{50} du nonylphénol supérieures à celles obtenues en milieu G+ et, d'autre part, que l'algue la moins sensible à l'action du nonylphénol s'avère être *T. suecica*. Si en milieu f/2, la CSEO et la CE_{50} de *C. calcitrans*, respectivement de 11,9 de 31,9 µg/L, apparaissent plus élevée que celles d'*I. galbana* dont les valeurs ne sont que de 8,5 et 24,9 µg/L, en milieu G+ la différence s'avère moins importante puisque les CSEO sont respectivement de 4,52 et 4,05 et les CE_{50} sont de 12,3 et 10,7 µg/L. Toutefois, c'est *C. calcitrans* qui a été retenue pour l'étude de l'action du nonylphénol sur quelques paramètres physiologiques, afin de permettre une comparaison avec l'action de l'époxiconazole.

Tableau 16 : Effet du nonylphénol sur la croissance de trois algues phytoplanctoniques, mesurée après 3 jours de culture dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue. Valeurs CSEO et CE_{50} exprimées en µg de nonylphénol/L ± ES.

		C. calcitrans	*I. aff. galbana*	*T. suecica*
Milieu f/2	**CSEO**	11,9 ± 2,05	8,5 ± 2,17	17,5 ± 1,23
	CE_{50}	31,9 ± 3,13	24,9 ± 2,3	61,9 ± 0,59
Milieu G+	**CSEO**	4,52 ± 1,17	4,05 ± 0,86	8,21 ± 0,94
	CE_{50}	12,3 ± 0,63	10,7 ± 0,89	14,2 ± 1,00

2. Effet sur la croissance de *C. calcitrans*

L'effet du nonylphénol a été étudié sur la croissance au cours du temps de *C. calcitrans*, cultivée dans les deux milieux de culture : f/2 et G+, en lumière continue (Figure 30 A, B).

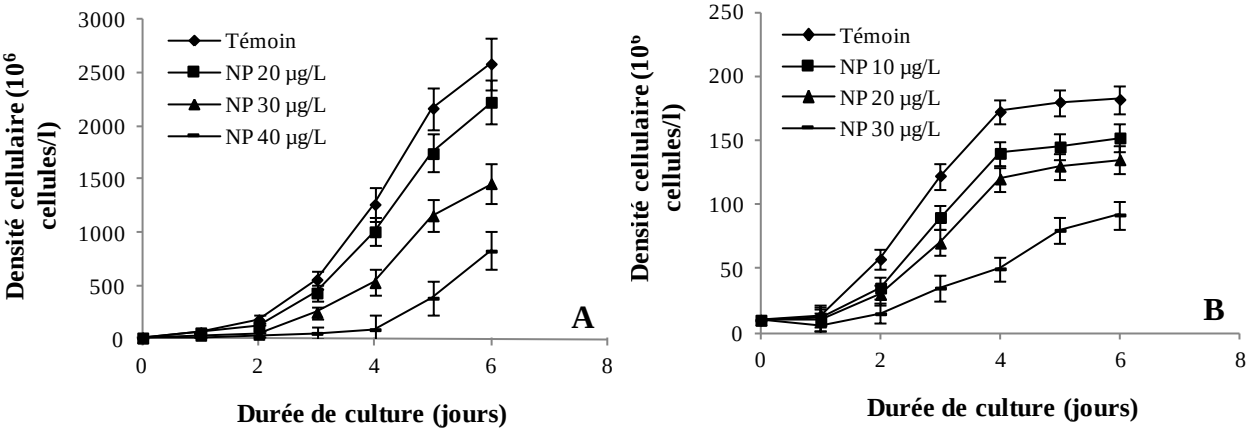


***Figure 30 A, B** : Effet au cours du temps du nonylphénol (NP, µg/L), ajouté à différentes concentrations dans le milieu de culture, sur la croissance de C. calcitrans, cultivée en lumière continue. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. **A**) milieu f/2 ; **B**) milieu G+.*

La présence du nonylphénol dans le milieu de culture induit une inhibition immédiate de la croissance, qui est fonction de la concentration en cet adjuvant et qui se révèle plus marquée en milieu G+ (Figure 30B) qu'en milieu f/2 (Figure 30A) ; ainsi, à 3 j de culture, en présence de 20 µg/L, les densités cellulaires sont réduites de 22 % et 43 % respectivement en milieu f/2 (Figure 30A) et en milieu G+ (Figure 30B). Dans les deux cas, l'effet inhibiteur s'atténue au cours du temps mais subsiste encore après 6 j de culture, avec des inhibitions de 14 et 26 % respectivement en milieux f/2 et G+.

3. Effet sur la teneur en pigments

La présence de 20 µg/L nonylphénol dans le milieu de culture amplifie l'augmentation de la teneur en pigments qui se produit naturellement chez le témoin à 1 j de culture ; ainsi, cet adjuvant produit des augmentations de la chorophylle a (Figure 31A) de la chorophylle c (Figure 31B) et des caroténoïdes (Figure 31C) qui sont respectivement de 68 %, 31 % et 37 %. Cet effet stimulateur disparaît ensuite progressivement.

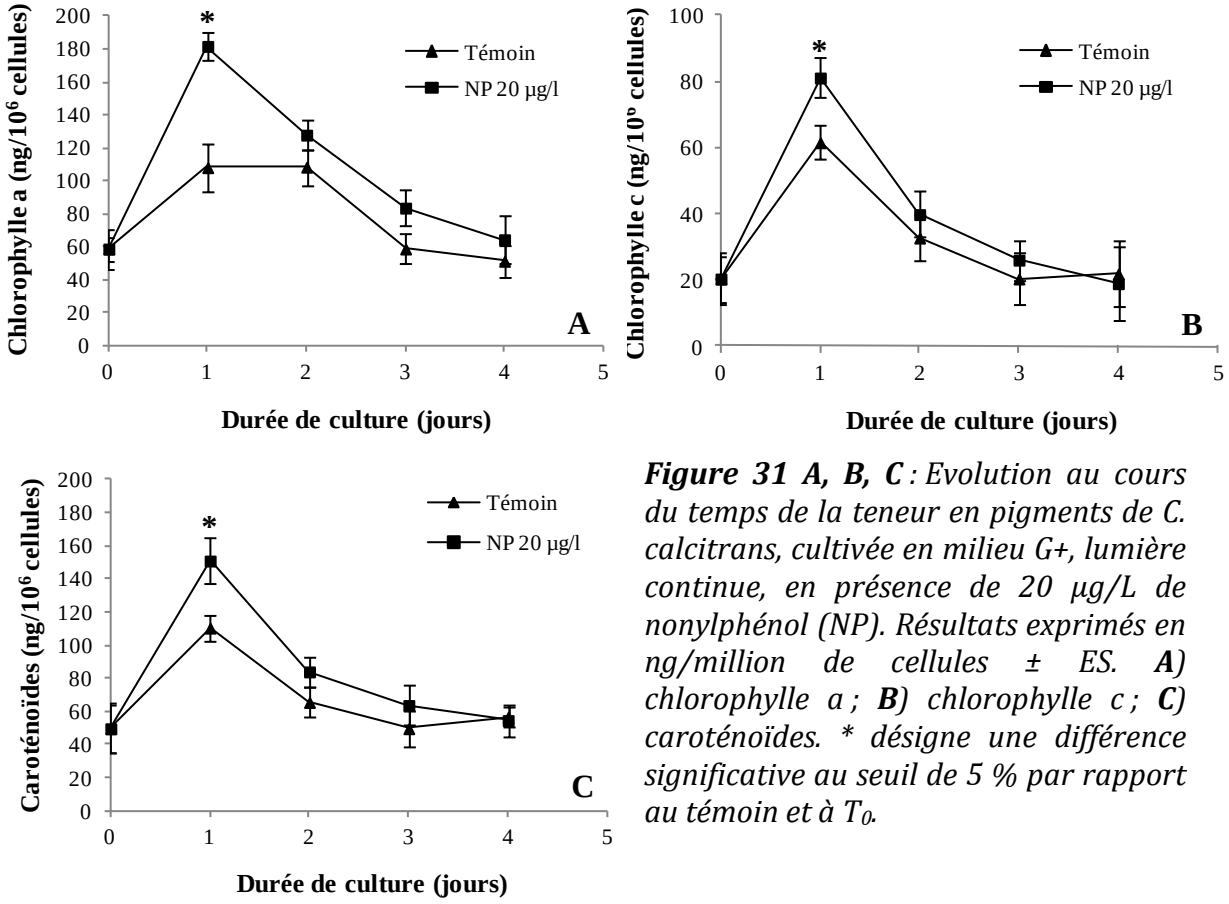


***Figure 31 A, B, C** : Evolution au cours du temps de la teneur en pigments de C. calcitrans, cultivée en milieu G+, lumière continue, en présence de 20 µg/L de nonylphénol (NP). Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. **A)** chlorophylle a ; **B)** chlorophylle c ; **C)** caroténoïdes. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin et à T_0.*

4. Effet sur la teneur en ATP

La présence de nonylphénol dans le milieu de culture, permet d'allonger la phase d'élévation de la teneur en ATP qui se produit naturellement chez le témoin pendant les deux premiers jours de la culture (Figure 32). En effet, lorsque 10 µg/L de nonylphénol sont ajoutés au milieu, la teneur en ATP atteint un maximun à 3 j de culture et ceci se traduit alors par une stimulation significative de 53 % cependant qu'en présence de 20 µg/L de nonylphénol, l'augmentation de la teneur en ATP se poursuit pendant 4 j, induisant une stimulation de la teneur du nucléotide de 89 % par rapport au témoin. Après avoir atteint ces maxima, la teneur en ATP diminue progressivement et devient, à 6 j de culture, non significativement différente de celle du témoin.

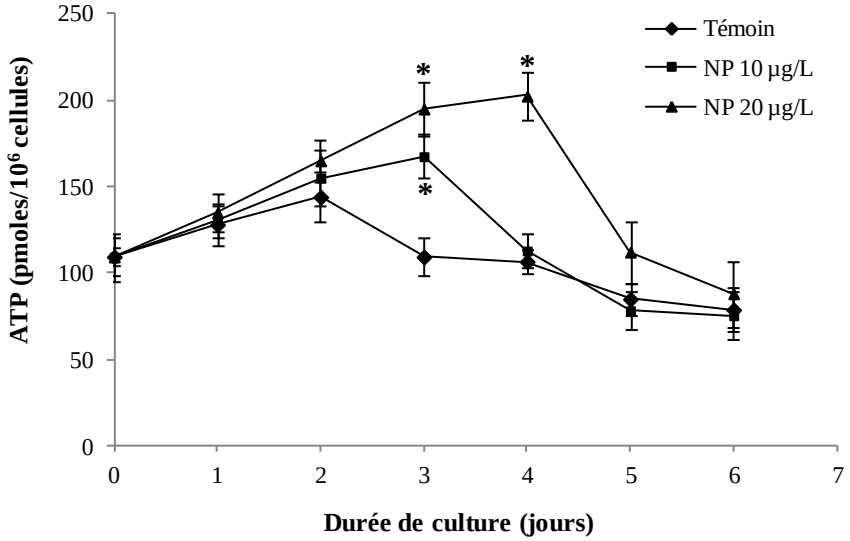


Figure 32 : *Evolution en fonction de la durée de culture, de la teneur en ATP de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière continue, en présence ou non de nonylphénol (NP). Résultats exprimés en pmoles/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin et à T_0.*

5. Effet sur la vitesse de la photosynthèse et de la respiration

La mesure des échanges gazeux a été effectuée sur des cultures âgées de 2 à 6 j. Les tableaux 17, 18 et 19 montrent que, chez les témoins, les vitesses de respiration et de photosynthèse sont maximales après 2 j de culture, chutent fortement à 3 j et diminuent ensuite plus lentement.

5.1. Action aiguë

Les données du tableau 16 rapportent l'action aiguë du nonylphénol sur la respiration et la photosynthèse de *C. calcitrans*, cultivée en lumière continue.

Tableau 17 : Action aiguë du nonylphénol sur la respiration et la photosynthèse en fonction de l'âge de la culture (millions de cellules/L) de *C. calcitrans* (milieu f/2 ; lumière continue). Vitesses mesurées après 1 h d'action, exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin.

Jours	*C. calcitrans* (10^6 cellules/L)		Nonylphénol µg/L					
			0	**0,625**	**1,25**	**2,5**	**5**	**10**
2 j	356	**Phot**	8,02 ± 0,91	14,36 ± 1,31 (179 %)	6,79 ± 1,47 (85 %)	4,69 ± 1,87 (58 %)	3,85 ± 0,73 (48 %)	2,81 ± 0,41 (35 %)
		Resp	6,17 ± 0,18	8,15 ± 0,31 (132 %)	4,57 ± 1,01 (74 %)	2,79 ± 0,44 (45 %)	1,45 ± 0,44 (24 %)	1,79 ± 0,37 (29 %)
3 j	492	**Phot**	5,37 ± 0,64	7,94 ± 0,82 (148 %)	5,26 ± 0,63 (98 %)	3,97 ± 0,65 (74 %)	3,49 ± 0,53 (65 %)	3,01 ± 0,91 (56 %)
		Resp	2,40 ± 0,71	2,52 ± 0,99 (105 %)	2,06 ± 0,51 (86 %)	2,04 ±0,47 (85 %)	1,78 ± 0,21 (74 %)	1,54 ± 0,27 (64 %)
4 j	1221	**Phot**	2,21 ± 0,88	2,67 ± 0,36 (121 %)	2,49 ± 0,21 (113 %)	2,21 ± 0,32 (100 %)	1,94 ± 0,32 (88 %)	1,95 ± 0,42 (88 %)
		Resp	1,06 ± 0,39	1,16 ± 0,29 (109 %)	1,22 ± 0,16 (115 %)	1,22 ± 0,22 (115 %)	1,13 ± 0,43 (106 %)	1,18 ± 0,24 (111 %)
5 j	1420	**Phot**	1,27 ± 0,21	1,08 ± 0,35 (85 %)	1,28 ± 0,22 (101 %)	1,22 ± 0,39 (96 %)	1,19 ± 0,65 (94 %)	1,59 ± 0,46 (125 %)
		Resp	0,79 ± 0,12	0,73 ± 0,29 (93 %)	0,76 ± 0,09 (96 %)	0,88 ± 0,11 (111 %)	0,71 ± 0,32 (90 %)	0,86 ± 0,32 (108 %)

A faible concentration (0,625 µg/L), le nonylphénol induit, chez une culture âgée de 2 j, une forte augmentation de la vitesse de photosynthèse (+ 79 %), qui s'atténue ensuite chez des cultures de 3 j (+ 48 %) et plus encore de 4 j (+ 21 %) ; cette stimulation disparaît ensuite chez des cultures plus âgées. Parallèlement le même effet est constaté pour la respiration mais de façon atténuée.

A partir d'une concentration en nonylphénol de 1,25 µg/L, des inhibitions des échanges gazeux sont observées et ces inhibitions sont à la fois fonction de la concentration en nonylphénol et de l'âge de la culture utilisée. Ainsi, chez une culture âgée de 2 j, les inhibitions de la photosynthèse et de la respiration, respectivement de 15 et 26 % en présence de 1,25 µg/L de nonylphénol s'élèvent à 65 et 71 % en présence de 10 µg/L de l'adjuvant. Ces mêmes effets du nonylphénol sont encore observés mais de façon atténuée chez une culture âgée de 4 j et, chez une culture de 5 j, il faut utiliser une concentration en nonylphénol de 5 et 10 µg/l pour induire une légère diminution de la photosynthèse (12 %).

5.2. Action chronique

L'influence du nonylphénol, ajouté au milieu de culture, a été étudiée sur les vitesses de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans*, cultivée dans les deux milieux : G+ et f/2, en lumière continue.

5.2.1. Milieu G+

Quel que soit l'âge de la culture, le nonylphénol, présent dans le milieu, induit une stimulation de la photosynthèse qui va croissant avec la concentration du contaminant (Tableau 18). Faible (14-30 %) voire nulle en présence de 10 µg/L en nonylphénol, la stimulation devient, en présence de 30 µg/L de nonylphénol, extrêmement importante, étant comprise entre + 335 et + 395 %. Le même effet fortement stimulateur par le nonylphénol (20 et 30 µg/L) de la respiration est observé ; toutefois, à la concentration de 10 µg/L, le nonylphénol induit des effets pouvant être soit légèrement stimulateurs soit légèrement inhibiteurs.

Tableau 18 : Influence du nonylphénol, présent à différentes concentrations dans le milieu de culture G+, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans* mesurée après 2, 3, 4, 5 et 6 jours de culture, en lumière continue. Vitesses exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin.

Jours		Nonylphénol µg/L			
		0	10	15	20
2 j	Phot	6,22 ± 1,03	8,08 ± 1,27 (130 %)	17,12 ± 1,69 (275 %)	30,78 ± 2,79 (495 %)
	Resp	4,16 ± 0,92	5,09 ± 1,23 (122 %)	16,99 ± 1,99 (409 %)	21,25 ± 2,98 (511 %)
3 j	Phot	3,74 ± 0,83	3,67 ± 0,87 (98 %)	9,65 ± 0,93 (258 %)	18,09 ± 2,03 (484 %)
	Resp	1,32 ± 0,26	1,33 ± 0,54 (101 %)	2,74 ± 0,87 (207 %)	6,35 ± 1,07 (481 %)
4 j	Phot	1,77 ± 0,39	2,05 ± 0,75 (116 %)	4,31 ± 0,71 (244 %)	8,58 ± 2,19 (484 %)
	Resp	0,98 ± 0,15	0,75 ± 0,11 (76 %)	2,02 ± 0,63 (206 %)	5,72 ± 1,48 (583 %)
5 j	Phot	1,04 ± 0,09	1,19 ± 0,19 (114 %)	2,14 ± 0,77 (205 %)	4,53 ± 1,87 (435 %)
	Resp	0,57 ± 0,03	0,44 ± 0,17 (78 %)	0,80 ± 0,13 (140 %)	1,58 ± 0,49 (279 %)
6 j	Phot	1,12 ± 0,41	1,36 ± 0,23 (122 %)	2,15 ± 0,89 (193 %)	4,36 ± 1,23 (391 %)
	Resp	0,50 ± 0,07	0,54 ± 0,07 (108 %)	0,84 ± 0,11 (170 %)	1,49 ± 0,49 (300 %)

5.2.2. Milieu f/2

A l'exception d'un effet inhibiteur induit par la plus faible concentration en nonylphénol (2,5 µg/L) après 2-3 j de culture, le nonylphénol produit une stimulation des échanges gazeux qui va croissant avec la concentration en cet adjuvant (Tableau 19). Ainsi, après 4 j de culture où les effets sont maximum, les vitesses de photosynthèse et de respiration sont respectivement augmentées d'un facteur 2 et 2,5 par la présence de 2,5 µg/L en nonylphénol mais sont multipliées par 11 et 16 fois lorsque la concentration en nonylphénol s'élève à 20 µg/l.

Tableau 19 : Influence du nonylphénol, présent à différentes concentrations dans le milieu de culture f/2, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de *C. calcitrans.* Vitesses exprimées en μLO_2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin, en fonction de l'âge de la culture (jours).

Jours		Nonylphénol (µg/L)				
		0	2,5	5	10	20
2 j	Phot	15,5 ± 2,66	14,5 ± 1,82 (93 %)	16,5 ± 1,67 (106 %)	21,1 ± 2,78 (136 %)	22,8 ± 2,71 (147 %)
	Resp	9,24 ± 1,34	5,80 ± 0,96 (63 %)	10,57 ± 2,60 (114 %)	15,2 ± 2,05 (165 %)	20,3 ± 2,83 (220 %)
3 j	Phot	2,49 ± 0,53	2,03 ± 0,88 (81 %)	3,57 ± 1,93 (143 %)	3,87 ± 0,43 (155 %)	7,74 ± 0,76 (311 %)
	Resp	1,86 ± 0,42	2,03 ± 0,71 (109 %)	3,57 ± 0,87 (192 %)	3,87 ± 0,43 (208 %)	7,74 ± 0,76 (416 %)
4 j	Phot	0,90 ± 0,26	1,79 ± 0,49 (199 %)	2,47 ± 0,48 (274 %)	2,88 ± 0,32 (321 %)	3,98 ± 1,36 (442 %)
	Resp	0,73 ± 0,19	1,32 ± 0,37 (181 %)	2,47 ± 0,48 (338 %)	2,88 ± 0,45 (394 %)	5,06 ± 1,08 (693 %)
5 j	Phot	1,10 ± 0,52	2,08 ± 0,26 (189 %)	2,34 ± 0,33 (212 %)	2,73 ± 0,67 (248 %)	4,40 ± 0,93 (400 %)
	Resp	0,82 ± 0,29	1,21 ± 0,38 (149 %)	2,34 ± 0,71 (286 %)	2,73 ± 0,67 (334 %)	4,40 ± 0,93 (540 %)

Il est à noter que chez le témoin les vitesses des échanges gazeux sont, à 2 j de culture, plus de deux fois supérieures à celles observées dans le milieu G+, moins riche en nitrate et en phosphate (Tableau 18). Par ailleurs, qu'il s'agisse du milieu G+ ou f/2, en dépit des effets stimulateurs produits par le nonylphénol, on observe comme chez le témoin, une diminution progressive des vitesses de photosynthèse et de respiration avec l'avancée en âge de la culture (Tableaux 18 et 19).

6. Effet sur le volume cellulaire

Lorsque le nonylphénol (20 µg/L) est présent dans le milieu de culture (G+), il induit à 2 j de culture une augmentation significative de 43 % du volume des cellules (Figure 33). Cette stimulation, atténuée (+ 14 %) mais encore significative à 3 j de culture, disparaît ensuite progressivement.

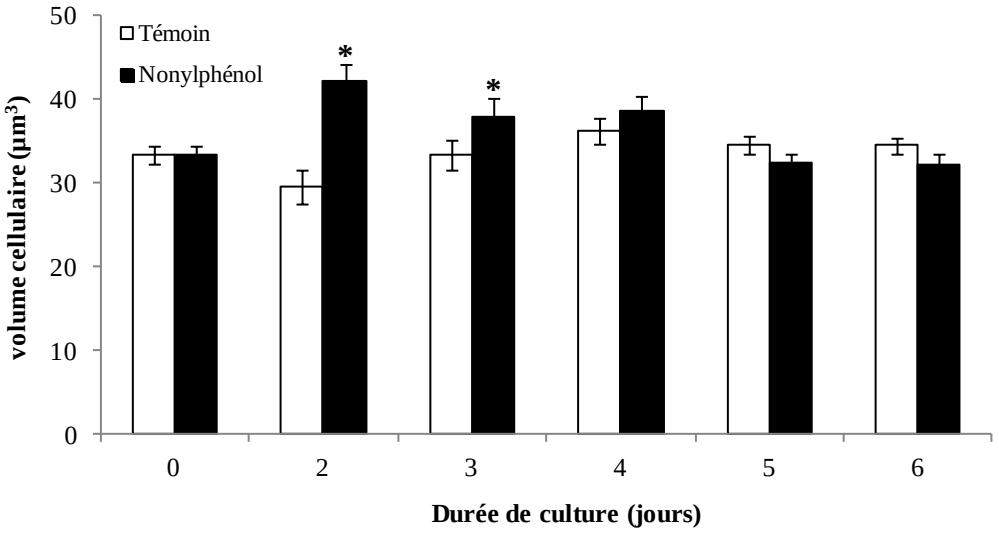


Figure 33 : *Volume cellulaire de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue, en présence ou non de 20 µg/L de nonylphénol. Résultats exprimés en* $\mu m^3 \pm ES$. * *désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin et à* T_0.

III. Discussion

Les résultats montrent que l'époxiconazole, inhibiteur de la biosynthèse des stérols, induit une réduction de la croissance des trois microalgues marines : *C. calcitrans, I. aff. Galbana et T. suecica.* La présence du fongicide durant 3 j de culture se traduit, en milieu G+, par des valeurs de CSEO comprises entre 0,57 et 0,74 mg/L et des valeurs de CE_{50} comprises entre 1,37 et 2,31 mg/L. Ces valeurs se situent dans la gamme obtenue pour *Dunaliella tertiolecta* par Baird et DeLorenzo (2010) concernant l'hexaconazole, le propiconazole, le triadimenol et le triadimefon ; ces quatre fongicides conazoles induisant des CE_{50} (96 h ; milieu f/2) variant de 0,91 à 5,98 mg/L. Il apparaît ainsi que les CE_{50} obtenues pour les différents fongicides triazoles vis-à-vis des algues marines testées sont également toutes comprises dans la très large gamme obtenue par Ma *et al*. (2002) dans son étude portant sur l'action de onze fongicides ; en effet, utilisant deux algues d'eau douce : *Scenedesmus obliqnus* et *Chlorella pyrenoïdosa*, ces auteurs rapportent des CE_{50} (96 h) variant dans de grandes proportions puisque comprises entre 0,0525 et 137,8 mg/l. L'utilisation d'époxiconazole sous sa formulation commerciale Opus conduit à des valeurs de CSEO et de CE_{50} qui montrent une sensibilité différente des trois microalgues vis-à-vis de ce contaminant. En effet, en milieux G+ et f/2, *C. calcitrans* avec des valeurs de CSEO de 1,29 et 3,1 µg/L, apparaît plus sensible à l'Opus que *T-iso* pour laquelle des valeurs de CSEO de 2,06 et 3,84 µg/L sont obtenues. *T. suecica* s'avère la microalgue la moins sensible à l'Opus puisque la CSEO est supérieure à 100 µg/L. Les valeurs de CE_{50} obtenues pour *C. calcitrans* et *I. aff. galbana,* en présence d'Opus sont respectivement de 4,47 et 6,46 µg/L en milieu f/2 et de 2,9 et 4,33 µg/L en milieu G+. Ces valeurs, qui sont trois ordres de grandeurs inférieures à celles obtenues en présence de la molécule pure d'époxiconazole, suggèrent que les adjuvants contribuent à augmenter l'absorption de l'époxiconazole par le phytoplancton et la participation des adjuvants est également retrouvée au niveau de la mesure des échanges gazeux. Ce rôle des adjuvants dans le développement de la toxicité a déjà été souligné pour différents herbicides aussi bien pour des algues d'eau douce (Caux *et al*., 1996 ; Martin Tsui et Chu, 2003 ; Pereira *et al*., 2009 ; Lipok *et al*., 2010) que pour des algues marines (Martin Tsui et Chu, 2003 ; Hourmant *et al*., 2009 ; Lipok *et al*., 2010). Si les travaux de Ma *et al*. (2002), Guida *et al.* (2008), Dosnon-Olette *et al*. (2010) et l'analyse de différentes données réalisée par Tremolada *et al.* (2004) font état d'une action inhibitrice de fongicides sur la croissance de microalgues d'eau douce, peu de

données existent quant à l'action comparée des molécules actives et de leurs formulations commerciales sur le phytoplancton. Comme les adjuvants des pesticides sont vraisemblablement relâchés dans l'environnement durant les applications, il paraît important d'évaluer, outre la toxicité de la molécule active, celle également de la formulation commerciale. C'est en effet, la formulation qui va se retrouver dans l'écosystème marin bien que, dans une revue récente, Creton *et al.* (2010) considèrent que la prise en compte de la formulation dans l'homologation est rarement scientifiquement justifiée et recommandent même une révision de la législation européenne.

Ces résultats montrent donc qu'un fongicide peut affecter la croissance d'organismes non cibles, de la même façon que cela a été rapporté pour les microalgues d'eau douce et les cyanobactéries par des insecticides (Mohapatra et Mohanty, 1990 ; Arzul *et al*., 2006).

La sensibilité des micro-algues au fongicide s'avère fonction des conditions de culture utilisées : richesse en sels nutritifs du milieu et éclairement, deux facteurs déterminants dans la vitesse de croissance et de division cellulaire. Ainsi, les conditions optimales de croissance (milieu f/2, lumière continue) permettent d'obtenir, à 3 j, des densités cellulaires 4 à 5 fois supérieures à celles observées en milieu de Gabès et lumière alternée. Il en résulte des inhibitions par l'époxiconazole (2,3 µg/L) de la densité cellulaire qui sont, sous ces deux conditions, respectivement de 62 % et 91 % et qui traduisent donc une atténuation de la toxicité du fongicide avec l'élévation de la densité cellulaire. Ceci s'accorde avec les travaux de Sbrilli *et al.* (2003, 2005) qui montrent que la richesse du milieu en sels nutritifs, par leur action stimulatrice de la croissance, peut masquer l'effet des toxiques. Par ailleurs, quelles que soient les conditions utilisées, l'effet inhibiteur de l'époxiconazole s'atténue au cours de la durée de la culture et cette atténuation de la toxicité pourrait là aussi résulter de l'élévation de la densité cellulaire.

On ne peut toutefois exclure que ne se produise la mise en place d'un processus de détoxification ou une dégradation de l'époxiconazole bien que cette molécule paraît être relativement stable ; en effet, une DT_{50} de 14-39 j a été rapportée chez les plants de riz par Lin *et al*. (2001) et sa dégradation dans le sol par l'activité microbienne se traduit

par une DT_{50} de 2-3 mois (Tomlin, 2000) de 89-139 j dans les sols forestiers (Passeport *et al*. (2011) voire même > 400 j (Bromilow *et al*., 1999).

L'époxiconazole est connu pour être un inhibiteur puissant de la synthèse des stérols fongiques mais également des phytostérols, en agissant sur l'activité de la C14α-déméthylase dépendante du cytochrome P450 (Kwok et Loeffler, 1993 ; Benton et Cobb, 1997). Cette modification de la biosynthèse des phytostérols par l'époxiconazole, le propiconazole mais également par d'autres composés triazoles retardants de croissance tels que le paclobutrazol et le tetcyclacis se traduit par une réduction de la croissance des plantes ou des cellules en suspension (Grossmann *et al*., 1985 ; Haughan *et al*., 1988 & 1989 ; Benton et Cobb, 1995 & 1997 ; Tuckey *et al*., 2002). Le rôle important joué par les stérols dans la division cellulaire a été souligné par Grossmann *et al*. (1985) qui montrent que l'effet inhibiteur du tetcyclacis peut être neutralisé par l'addition au milieu de culture de différents stérols dont le stigmastérol et le sitostérol, constituant respectivement 0,8 % et 40 % des stérols totaux chez *C. calcitrans* (Napolitano *et al*., 1993 ; Soudant *et al*., 1998).

Par ailleurs, il est bien connu que les composés triazoles inhibent la biosynthèse des gibbérellines endogènes (Graebe, 1987 ; Rademacher, 2000), retardant ainsi le développement des plantes. Les gibbérellines ont été mises en évidence chez quelques algues vertes (Mowat, 1965 ; Jennings 1968 ; Crouch and Van Staden, 1993). On ne peut donc exclure qu'une inhibition de leur biosynthèse ne participe à la réduction de la division cellulaire bien que cela ne constitue pas en général une de leurs fonctions majeures et que les gibbérellines exogènes ont été montrées inhiber la croissance de *Chaetoceros spp* (Johnston, 1963).

En même temps qu'il inhibe la division cellulaire, l'époxiconazole produit une augmentation du volume des cellules et cet effet disparaît avec l'atténuation au cours du temps de l'inhibition de la division cellulaire. Une relation linéaire positive a également été mise en évidence entre l'inhibition de la croissance par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et le volume cellulaire (Echeveste *et al.* 2010). Par ailleurs, Baird et DeLorenzo (2010) rapportent des effets similaires concernant *Dunaliella tertiolecta,* à savoir un gonflement des cellules et une inhibition de la division cellulaire,

après 96 h d'exposition à quatre fongicides triazoles , ces effets s'accompagnent d'une forte élévation de la teneur en lipides totaux sans qu'un impact sur la fonction osmorégulatrice ne soit observé ; en effet, la teneur en glycérol, osmolyte très actif chez cette chlorophyte, n'est pas modifiée. Il semble donc que l'augmentation du volume cellulaire soit attribuable avant tout à une altération de la structure membranaire.

L'action de l'époxiconazole sur la division cellulaire de *C. calcitrans* s'accompagne d'une perturbation du métabolisme et plus précisément des échanges gazeux.

Ainsi, en action aiguë, l'époxiconazole produit, à faible concentration, une légère stimulation des échanges gazeux ; ce phénomène connu sous le nom d'hormèse correspond à une accélération du taux de croissance et par conséquence des mécanismes physiologiques lorsque le stress imposé est relativement faible (Stebbing, 1998a). A plus forte concentration, l'époxiconazole induit une inhibition de la respiration et de la photosynthèse, fonction de la concentration en fongicide, et qui s'atténue avec l'avancée en âge de la culture. De nombreux travaux ont montré que la composition en lipides, stérols et acides gras varie non seulement avec les conditions de culture (nutrition, lumière) mais aussi avec le stade de croissance (Piorreck et Pohl, 1984 ; Véron *et al*., 1996 ; Piretti *et al*., 1997 ; Tuckey *et al*., 2002). Cette variation de la composition en lipides au cours de la croissance se traduit chez *Chlorella fusca var. vacuolata* par un changement de sensibilité au propiconazole ; la capacité de la cellule algale à absorber et à séquestrer ce xénobiotique lipophile apparaît dépendre de la composition quantitative et qualitative des composants membranaires (Tuckey *et al*., 2002). On peut, par analogie, émettre l'hypothèse qu'une modification de la composition en lipides des membranes se produise au cours de la phase de croissance de *C. calcitrans* qui entraîne une variation de l'absorption de l'époxiconazole, fongicide lipophile ; ceci rendrait alors compte de la variation d'inhibition des échanges gazeux qui est observée.

Par ailleurs, les fongicides triazoles ont été montrés capables d'altérer la perméabilité du plamalemme et du tonoplaste, indépendamment de l'inhibition de la biosynthèse des phytostérols (Romani et Beffagna, 1991 ; Colombo *et al*., 1991) mais peu d'études ont porté sur l'action aiguë des fongicides sur les mitochondries et les chloroplastes.

Toutefois, un retardant de croissance triazole tel que le paclobutrazol s'est avéré capable de modifier le transport d'électrons de mitochondries isolées *d'Alnus glutinosa*, l'augmentant à faible concentration et le réduisant à plus forte concentration (Bai et Chaney, 2001). Par ailleurs, dans des travaux récents, Domico *et al*. (2006 ; 2007) ont montré que, en même temps que certains fongicides (mancozeb et maneb) génèrent des désordres neurotoxiques aigus chez l'homme, ils causent une inhibition de la respiration mitochondriale et une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène.

En action chronique, l'époxiconazole induit également une perturbation des échanges gazeux ; à l'exception d'une inhibition de la photosynthèse produite après 2 j de culture en milieu f/2, l'époxiconazole induit une augmentation de la photosynthèse et de la respiration qui est fonction de la concentration en fongicide. Cette action, spectaculaire en présence de 3,6 µg/L en époxiconazole, s'avère encore plus marquée lorsque la culture est effectuée en milieu G+ puisque les vitesses de photosynthèse et de respiration sont respectivement multipliées par un facteur 4 et 6. Ceci confirme que la richesse du milieu peut masquer l'effet des toxiques.

Des résultats variés sont rapportés pour les effets à long terme des fongicides triazoles chez les plantes terrestres. Le traitement par l'époxiconazole se traduit par une inhibition de la respiration des feuilles de blé (Bertelsen *et al*., 2001) et par une réduction du transport d'électrons photosynthétiques des thylacoïdes du gaillet gratteron (Benton et Cobb, 1997). Une diminution de la photosynthèse est également observée après traitement de germinations d'épicéa au triadimefon mais est accompagnée d'une augmentation de la respiration (Sailerova et Zwiazek, 1996). En revanche, après exposition à l'époxiconazole de plants de marronnier et d'orge soumis à un stress hydrique, une augmentation de la photosynthèse est observée (Nason *et al*., 2007 ; Percival et Noviss, 2008). De nombreux travaux ont en effet montré que les triazoles, en activant les propriétés anti-oxydantes des plantes, permettent une protection vis-à-vis de différents stress biotiques et abiotiques incluant les pathogènes fongiques, la sécheresse, les polluants atmosphériques et les stress thermiques (Fletcher *et al*., 2000 ; Wu et von Tiedemann, 2002 ; Lin *et al*., 2006 ; Jaleel *et al*., 2007 & 2008 ; Nason *et al.*, 2007 ; Percival et Noviss, 2008 ; Baninasab, 2009 ; Srivastav *et al*., 2010).

Le fait qu'une élévation de la teneur en ATP soit concomitante de l'augmentation importante de la respiration et de la photosynthèse induite par l'époxiconazole chez *C. calcitrans* conduit à écarter l'hypothèse d'un découplage de la respiration et d'une altération du transport d'électrons photosynthétiques comme observé par Benton et Cobb (1997). Il semble alors plus vraisemblable que l'augmentation de la respiration puisse constituer une réponse au stress imposé par le fongicide (Levitt, 1980) et que l'augmentation de la photosynthèse soit imputable à l'accumulation transitoire des pigments qui se produit au cours de la culture. En effet, l'action inhibitrice sur la croissance induite par l'époxiconazole s'atténue en même temps que ses actions sur les échanges gazeux, sur la teneur en ATP et en pigments et sur le volume des cellules. Il semble donc que l'action première de l'époxiconazole soit avant tout de réaliser un blocage de la division cellulaire, duquel découle une augmentation transitoire du métabolisme. Des résultats similaires ont été rapportés concernant des herbicides tels que l'isoproturon et la bentazone respectivement par Rioboo *et al.*, (2002) chez *Chlorella vulgaris* et par Hourmant *et al.* (2009) chez *C. gracilis*.

L'inhibition de la croissance par l'époxiconazole sur la croissance apparaît dépendre du stade physiologique de croissance et /ou de la densité cellulaire auquel celui-ci est ajouté. En effet, plus l'addition du fongicide au cours de la phase exponentielle est tardive et moins la réduction de la densité cellulaire est importante, l'effet étant plus marqué en lumière alternée. Des résultats similaires ont été rapportés par Arzul *et al.* (2008) concernant l'isoproturon et le chlorpyriphos-éthyl pour des algues unicellulaires et interprétés comme résultant d'une plus grande bio-disponibilité (fmol/cellule) des pesticides en début de culture lorsque la densité cellulaire est faible. Ces résultats s'accordent également avec les observations de Moreno-Garrido *et al.* (2000) qui montrent que plus la densité cellulaire initiale est élevée et plus les valeurs de CE_{50} concernant le cuivre augmentent.

Quel que soit le stade de croissance où l'époxiconazole (Opus) est ajouté au milieu, il s'en suit une augmentation des échanges de l'oxygène et de la teneur en pigments et en ATP mais plus l'addition du fongicide est tardive et plus ces effets sont atténués. Ceci montre donc que plus l'action retardatrice de la division cellulaire est importante et plus

l'augmentation des paramètres physiologiques est accentuée et confirme que l'époxiconazole affecte différemment la division cellulaire et les processus physiologiques.

Lorsque le perturbateur endocrinien nonylphénol est ajouté au milieu de culture, il en résulte une inhibition de la croissance des trois algues étudiées. Cet effet inhibiteur est fonction de la nature de l'algue, avec par ordre décroissant de sensibilité : *I. aff. galbana, C. calcitrans et T. suecica,* se traduisant par des CSEO de 4,05, 4,52 et 8,21 et des CE_{50} de 10,75, 12,35 et 14,19 µg/L, obtenues en milieu G+. Cette gradation est retrouvée lorsque le milieu f/2 est utilisé mais, la richesse de ce milieu en phosphate et nitrate, permet d'atténuer les effets inhibiteurs du nonylphénol, conduisant à des valeurs de CE_{50} 2 à 4 fois plus élevées, comprises entre 25 et 62 µg/L. Ces valeurs s'avèrent nettement inférieures à celles rapportées antérieurement pour les microalgues d'eau douce : 0,5 mg/L (Graff *et al*., 2003), pour différentes souches de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* : de 0,67 à 2,96 mg/L, (Wang *et al*., (2007) et pour *Selenastrum capricornutum* et *Chlorella vulgaris* : 1 et 4 mg/L, (Gao et Tam, 2010). Des valeurs du même ordre de grandeur (3 et 11 mg/L) ont été rapportées pour le nonylphénol-10 concernant *Scenedesmus quadricauda* et *Chlorella vulgaris* (Ma *et al*., 2004). Ces données semblent indiquer une plus grande sensibilité des algues marines à l'action du nonylphénol, ce que semble confirmer les résultats récemment obtenus par Liu *et al.* (2010) qui rapportent une CE_{50} de 0,20 mg/L pour la diatomée marine *Navicula incerta,* valeur obtenue en milieu f/2 mais après 4 j de culture. A partir des nombreuses données analysées par Servos (1999), on peut voir également que la microalgue marine *Skeletonema costatum* (CE_{50} : 27 mg/L) présente une sensibilité nettement plus élevée à l'action aiguë du nonylphénol que les algues d'eau douce *Selenastrum capricornutum* (CE_{50} : 410 mg/L) et *Scenedesmus subspicatus* (CE_{50} : 1 300 mg/L).

Des teneurs en nonylphénol trouvées dans les eaux superficielles marines peuvent varier de quelques ng/L à plusieurs µg/L (Heemken *et al.,* 2001 ; Ying *et al*., 2002 ; Pojana *et al*., 2007 ; Li *et al.,* 2008). Le fait que, à une concentration en nonylphénol de 10 µg/L, une inhibition de la croissance de *C. calcitrans* cultivée dans un milieu proche des conditions naturelles (milieu G+), est observée indique que cet adjuvant peut

constituer une menace sérieuse pour le plancton et plus globalement pour les écosystèmes.

L'inhibition de la croissance induite par le nonylphénol est fonction de la concentration en adjuvant et s'atténue avec la durée de la culture ; ceci suggère que le nonylphénol pourrait être partiellement biodégradé comme récemment montré pour la diatomée *N. incerta* (Liu *et al*. 2010) et permettre ainsi une levée partielle de l'inhibition. La taille moyenne des diatomées généralement diminue durant la phase végétative de croissance (Round *et al.,* 1990). Alors, l'accroissement par le nonylphénol du volume des cellules qui est maximal à 2 j et qui s'atténue ensuite doit refléter l'inhibition de la division cellulaire qui est observée.

La réduction de la croissance s'accompagne d'une perturbation des échanges gazeux. En action aiguë, seules les cultures de 2 et 3 j semblent affectées par le nonylphénol. En effet, à l'exception de la plus faible concentration utilisée (0,625 µg/L) qui augmente les échanges gazeux, le nonylphénol produit une réduction de la photosynthèse et de la respiration, surtout importante chez les cultures de 2 j ; chez les cultures âgées de 4 et 5 j, l'effet tend à disparaître. Cette action toxique s'accorde avec les résultats rapportés par Correa-Reyes *et al.* (2007) qui constatent une inhibition totale de la photosynthèse chez *I. galbana*, après 1 h d'exposition au nonylphénol (1 mg/L) et, cet effet est corrélé à une accumulation rapide de l'adjuvant, se traduisant par un facteur de concentration de 6 940. Une inhibition de la fluorescence des algues d'eau douce *C. vulgaris* et *S. capricornutum* est également rapportée par Gao et Tam (2010) après 1 h d'exposition au nonylphénol (1 mg/L).

En revanche, en action chronique, le nonylphénol induit, à 15 et 20 µg/L, une forte augmentation des échanges gazeux, observée dès le deuxième jour de la culture et se maintenant pendant 5-6 j. Cette stimulation des échanges gazeux peut rendre compte de l'augmentation de la teneur en ATP qui est observée. Parallèlement, une augmentation de la teneur en pigments est constatée à un jour de culture, mais cette augmentation disparaît ensuite. Une absence d'effet sur la teneur en chlorophylles a de *N. incerta* et de *C. vulgaris* après une exposition de 96 h au nonylphénol a également été rapportée par Liu *et al*. (2010) et Gao et Tam (2010). L'augmentation transitoire de la teneur en

pigments induite par le nonylphénol ne permet donc pas d'expliquer l'élévation de la vitesse de photosynthèse observée tout au long de la culture. Ces résultats diffèrent des observations de Gao et Tam (2010) qui rapportent, sous l'effet de concentrations croissantes en nonylphénol pendant 96 h, une baisse de la teneur en chlorophylle a et du rendement photosynthétique de *S. capricornutum*, pouvant résulter du stress oxydatif généré par le nonylphénol. En raison des réductions similaires de la croissance et du rendement de photosynthèse, ces auteurs suggèrent que ces deux processus sont liés, la vitesse de croissance étant souvent corrélée à la production d'énergie.

L'ensemble des résultats montre donc que, de la même façon que l'époxiconazole (Opus), le nonylphénol affecte différemment la division cellulaire et les processus physiologiques ; en effet l'augmentation du volume cellulaire, de la photosynthèse et de la respiration et de la teneur en pigments et en ATP par le fongicide ou l'adjuvant semble avant tout découler de l'action retardatrice de ces toxiques sur la division cellulaire.

CHAPITRE IV

EFFET DES CONTAMINANTS CHIMIQUES SUR LES COMMUNAUTES NATURELLES DU GOLFE DE GABES

I. Effet des contaminants chimiques sur les populations naturelles de phytoplancton du golfe de Gabès (Décembre 2008)

L'étude de l'effet de deux pesticides le chlorpyrifos-éthyl (Dursban) et l'époxiconazole (Opus) testés seuls et en mélange et, d'un adjuvant, le nonylphénol, a été réalisée en microcosmes sur les populations naturelles de phytoplancton du golfe de Gabès et plus précisément de la lagune de Boughrara pendant une période de bloom du dinoflagellé *Karenia selliformis*, en décembre 2008.

1. Effets des contaminants sur la composition des populations de phytoplancton du golfe de Gabès

1.1. Composition de la population naturelle

L'étude de la composition taxonomique des populations naturelles du golfe de Gabès (la lagune de Boughrara) (Figure 34) montre qu'au moment du prélèvement (Témoin à T_0), la population phytoplanctonique était composée à 99 % de *K. selliformis* et de 1 % par d'autres dinoflagellés, essentiellement *Karlodinium veneficum*, *Oxytoxum sp*., *Polykrikoss sp*. et *Gymnodinium sp*. et de diatomées, principalement *Navicula sp.*, *Rhizosolenia sp.*, *Chaetoceros sp.* et *Nitschia sp.*

Au 6ème jour de l'expérience, le pourcentage de *K. selliformis* avait très peu varié (98 %), montrant la persistance du bloom de ce dinoflagellé dans le microcosme.

1.2. Influence des contaminants à 6 j de culture

Lorsque le chlorpyriphos-éthyl (Dursban) (0,5 ou 5 µg/L), le nonylphénol (0,25 µg/L) ou l'époxiconazole (Opus) (0,036 ou 0,36 µg/L) sont ajoutés à l'eau de mer, la composition phytoplanctonique des microcosmes reste très semblable à celle du témoin, avec la forte prédominance de *K. selliformis*, de l'ordre de 97-98 %. Par ailleurs, une très faible variation des autres espèces phytoplanctoniques est observée.

En revanche, l'ajout dans le microcosme d'une concentration en nonylphénol de 2,5 µg/L ou d'un mélange constitué de 0,5 µg/L de chlorpyriphos éthyl (Dursban) et de 0,036 µg/L d'époxiconazole (Opus), produit une modification de la composition taxonomique des populations de phytoplancton.

En effet, la présence du mélange insecticide + fongicide réduit, au 6ème j de l'expérience, la proportion de *K. selliformis* dans le microcosme qui reste toutefois largement prédominant, constituant 75 % de la densité phytoplanctonique. Parallèlement, on observe un développement du dinoflagellé *K. veneficum* qui, peu présent à T_0, représente 16 % de la population phytoplanctonique au 6ème jour. Par ailleurs, les diatomées, tout en restant proportionnellement minoritaires, ont fortement augmenté et constituent 9 % de la communauté phytoplanctonique , en raison d'un accroissement de *C. calcitrans* (2 %), de *Nitzschia* sp. (2 %), de *Rhizosolenia* sp. (2 %) et de *Navicula* sp. (3 %).

Une évolution similaire a été enregistrée dans le microcosme contaminé par 2,5 µg/L nonylphénol ; en effet, en présence de l'adjuvant, le pourcentage de *K. selliformis* a fortement diminué, passant de 98 % (à T_0) à 79 % cependant que la proportion du dinoflagellé *K. veneficum* a fortement augmenté, constituant 21 % de la population naturelle. Comparativement aux deux dinoflagellés, les diatomées restent peu représentées et constituent moins de 1 % de la communauté.

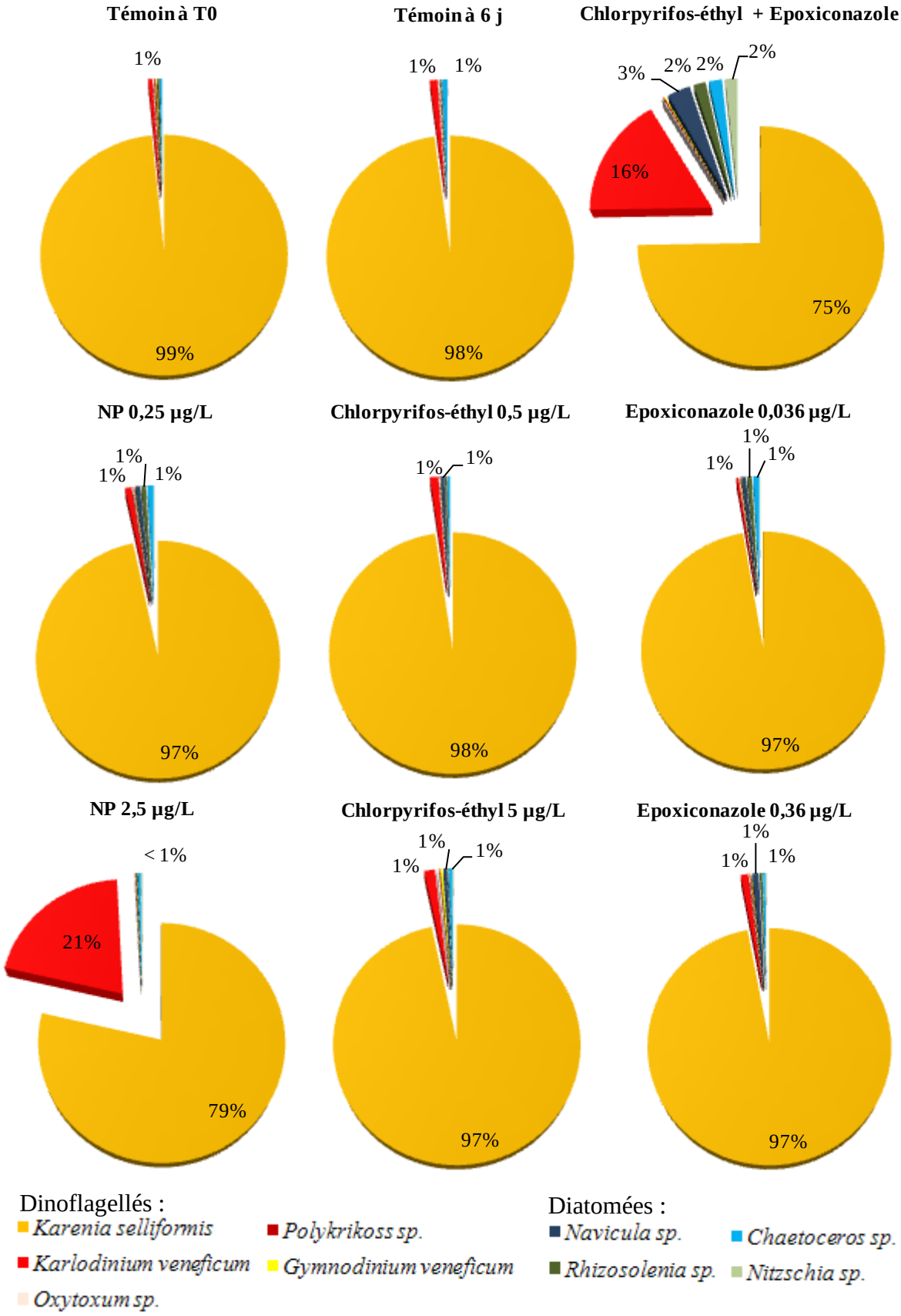


Figure 34 : *Composition taxonomique et abondance des principales espèces au sein de la population phytoplanctonique, dans les microcosmes au début et au 6ème jour de l'expérience.*

1.3. Influence des contaminants à 11 j de culture

La figure 35 rapporte les compositions taxonomiques après 11 j de culture dans les différents microcosmes traités ou non avec les différents contaminants.

Chez le témoin, après 11 j de culture, *K. selliformis* demeure l'espèce prédominante, représentant 97 % de la communauté phytoplanctonique dans le microcosme, comparativement à 99 % au début de la culture ; les 3 % restants étant constitués de diatomées et de quelques autres dinoflagellés.

Alors qu'après 6 j d'exposition au chlorpyriphos-éthyl (0,5 ou 5 µg/L), au nonylphénol (0,25 µg/L) ou à l'époxiconazole (0,036 ou 0,36 µg/L), peu de changement de la composition phytoplanctonique était observé, celle-ci est en revanche fortement modifiée à l'issue de 11 j de traitement (Figure 35).

Ainsi, le chlorpyriphos-éthyl à la concentration de 0,5 µg/L et plus encore de 5 µg/L, réduit les proportions de *K. selliformis* qui passent respectivement à 91 % et 50 %. L'accroissement important de la proportion des autres espèces en présence de 5 µg/L de chlorpyriphos-éthyl est majoritairement dû aux diatomées (38 %) et plus particulièrement à *C. calcitrans* (17 %) ; les dinoflagellés autres que *K. selliformis* constituant à parts égales les 12 % restants.

La présence de 0,25 µg/L de nonylphénol produit une réduction de la proportion de *K. selliformis* dans la population naturelle qui chute à 60 % cependant que celle de *K. veneficum* atteint une valeur de 12 % ; le reste des espèces se partageant les 4 % restants. Présent dans le microcosme à la concentration de 2,5 µg/L, le nonylphénol induit une augmentation spectaculaire du pourcentage de *K. veneficum* (96 %) cependant que *K. selliformis* ne représente plus que 3 %.

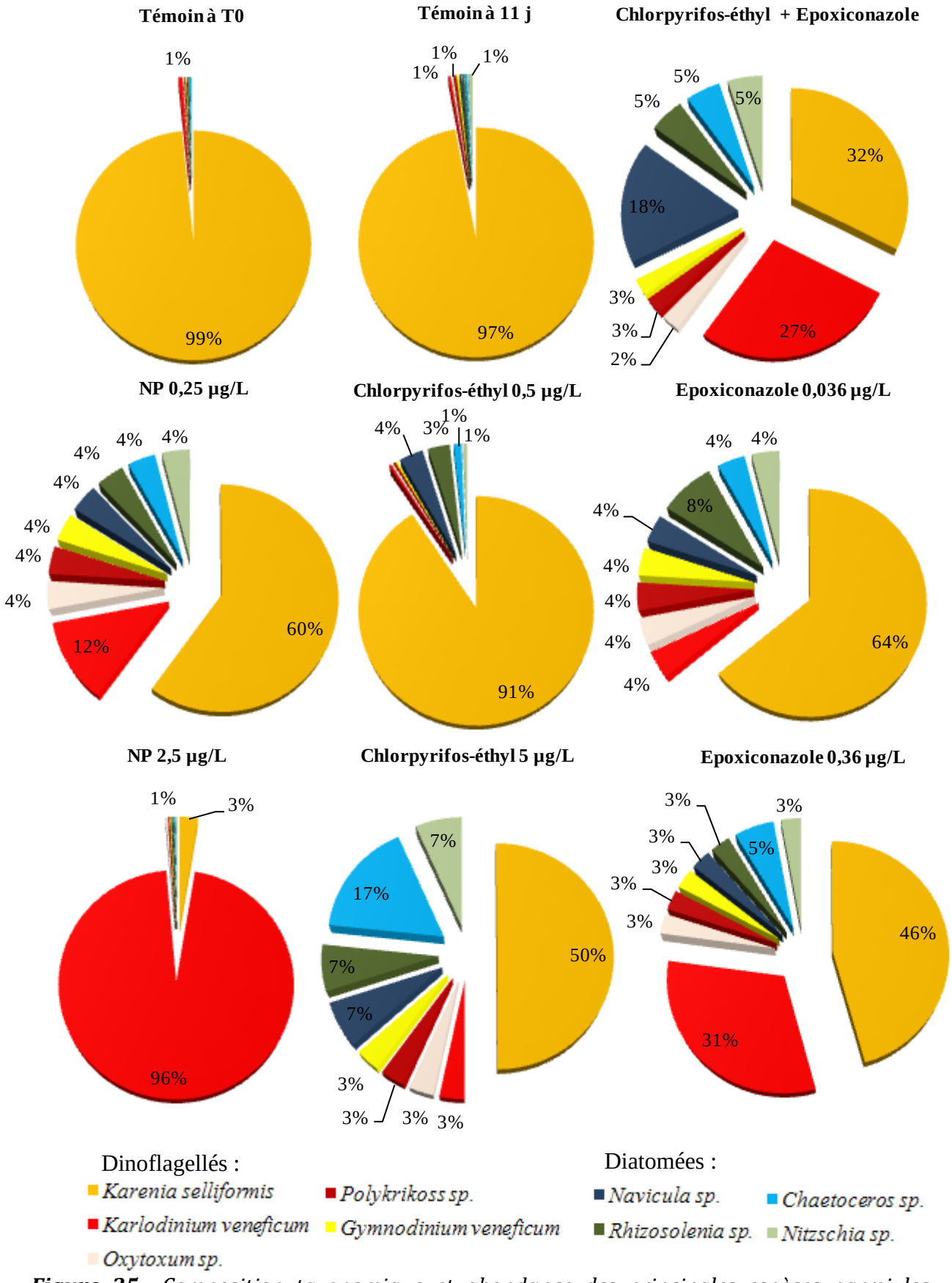


Figure 35 : *Composition taxonomique et abondance des principales espèces parmi les populations phytoplanctoniques présentes dans les microcosmes au début et à la fin de l'expérience (11 j).*

L'ajout au microcosme de 0,036 µg/L d'époxiconazole réduit à 64 % le pourcentage de *K. selliformis* et augmente celui de *Rhizosolenia sp.* à 8 % cependant que le pourcentage de chacune des autres espèces a également augmenté et est évalué à 46 %. Le traitement avec 0,36 µg/L d'époxiconazole accentue la diminution *de K. selliformis* qui chute à 46 % tandisque le dinoflagellé *K. veneficum* prend une part importante au sein de la communauté, en constituant 31% ; les autres espèces représentent chacune de 3 à 5 % des 13 % restants de la composition phytoplanctonique du microcosme.

L'addition au microcosme du mélange constitué par 0,5 µg/L de chlorpyriphos-éthyl (Dursban) et de 0,036 µg/L d'époxiconazole (Opus), accentue à 11 j les effets constatés après 6 j de traitement ; ainsi, on observe une réduction supplémentaire de la proportion de *K. selliformis* qui chute de 75 à 32 % cependant que le pourcentage de *K. veneficum* augmente de 16 à 27 %. Parallèlement, la proportion globale des diatomées s'accroît, évoluant de 9 à 33 %, avec une prédominance de *Navicula sp.* (18 %) ; les trois autres diatomées étant présentes à parts égales, de 5 % chacune.

2. Effet des contaminants sur la teneur en chlorophylle a

Les courbes de la figure 36 retracent les cinétiques d'évolution de la teneur en chlorophylle a de l'eau de mer, mesurée en présence des différents contaminants. Dans les microcosmes témoins, la teneur en chlorophylle a, initialement à 7,26 µg/L, chute dès le premier jour de la culture à une valeur de 5,1 µg/L puis évolue peu jusqu'au 7ème j pour ensuite diminuer progressivement jusqu'à la valeur de 2,18 µg/L à 10 j de culture.

La présence de chlorpyriphos-éthyl dans le microcosme produit une diminution de la teneur en chlorophylle a (Figure 36A) ; une réduction de 30-32 %, manifeste dès le premier jour sous l'effet de 0,5 µg/L de chlorpyriphos-éthyl se maintenant ensuite pendant 7 j mais apparaît plus progressivement en présence de 5 µg/L. A partir du 8ème jour, l'inhibition disparaît progressivement pour n'être plus que de 5 % au 10ème j. Le même phénomène est observé lorsque les cultures ont été contaminées par le nonylphénol (0,25 et 2,5 µg/L), avec des inhibitions de 49 % à 7 j de culture (Figure 36B**)**.

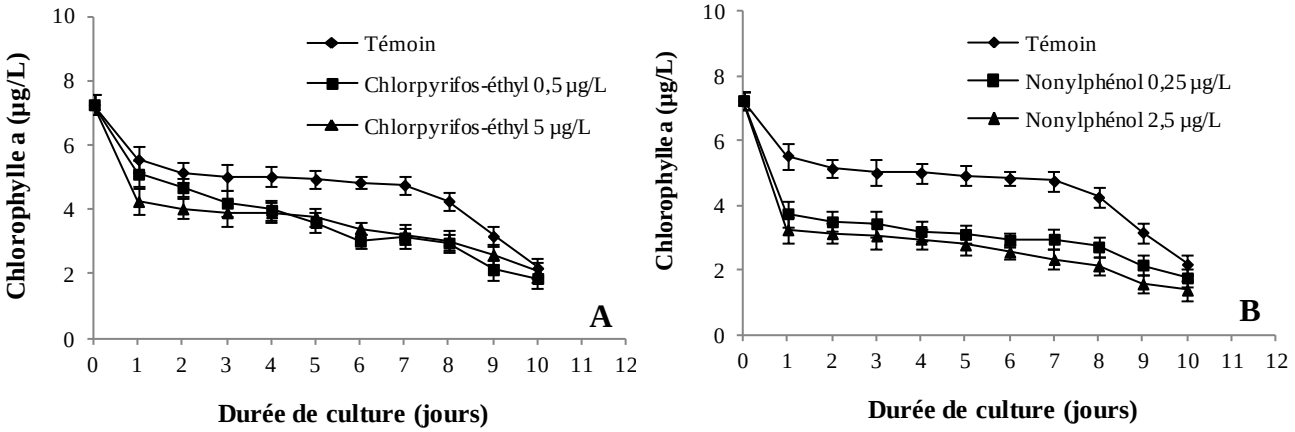


***Figure 36** : Effet du chlorpyriphos-éthyl (Dursban) (A) et du nonylphénol (B) sur l'évolution au cours du temps de la teneur en chlorophylle a dans les microcosmes. Résultats exprimés en µg/L ± ES.*

La présence de 0,036 µg/L d'époxiconazole dans le microcosme ne modifie pas la teneur en chlorophylle a dans l'eau de mer (Figure 37A). Par contre, lorsque l'époxiconazole est ajouté à la concentration de 0,36 µg/L, une nette diminution de la teneur en chlorophylle a est observée tout au long de la durée de l'expérience. En effet, à cette concentration l'époxiconazole produit une inhibition qui, de 14 % à 2 j, va croissant jusqu'à 10 j de culture, avec 47 % d'inhibition.

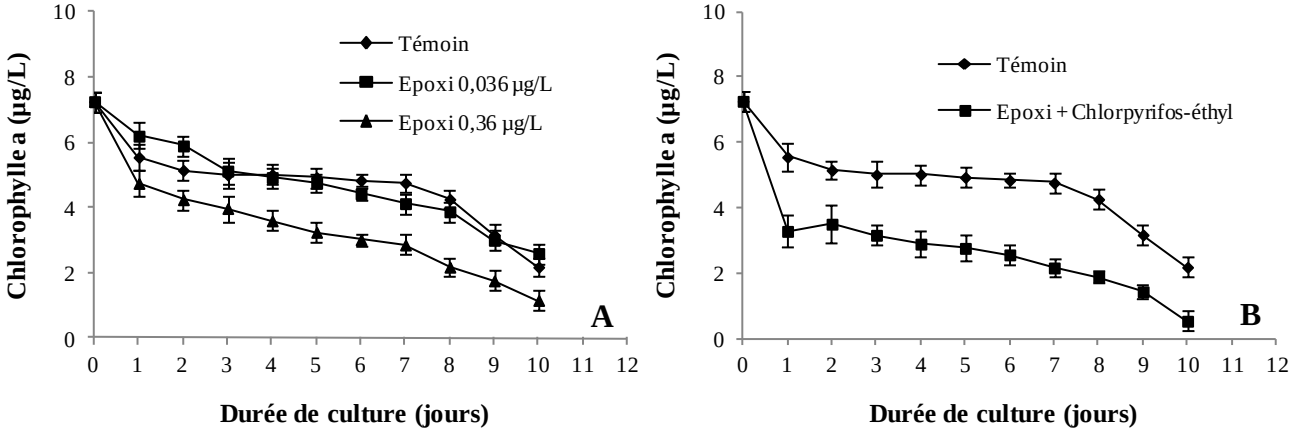


***Figure 37 A, B :** Effet de l'époxiconazole (Opus) testé seul (**A**) ou en mélange avec le chlorpyriphos-éthyl (Dursban) (**B**) sur l'évolution au cours du temps de la teneur en chlorophylle a dans les microcosmes. Résultats exprimés en µg/L ± ES.*

Lorsque l'époxiconazole et le chlorpyrifos-éthyl sont testés en mélange, une forte réduction de la teneur en chlorophylle a tout au long de la durée de la culture est

observée. Cette réduction, manifeste dès le 1er j, se maintient à 55 % pendant 7 j pour s'accentuer ensuite ; ainsi à 10 j, la teneur en chlorophylle a ne constitue plus que 24 % de celle trouvée dans le microcosme témoin (Figure 37B).

3. Effet des contaminants sur la teneur en sels nutritifs

3.1. Action sur la teneur en azote total et en phosphore

La figure 38 montre l'évolution des teneurs en azote total et phosphore en présence ou non des contaminants.

Chez le témoin, les teneurs en azote total et en phosphore évoluent peu au cours des 10 j de culture, et se maintiennent proches de valeurs moyennes, respectivement de 19,2 µmol/L et 1,78 µmol/L (Figure 38).

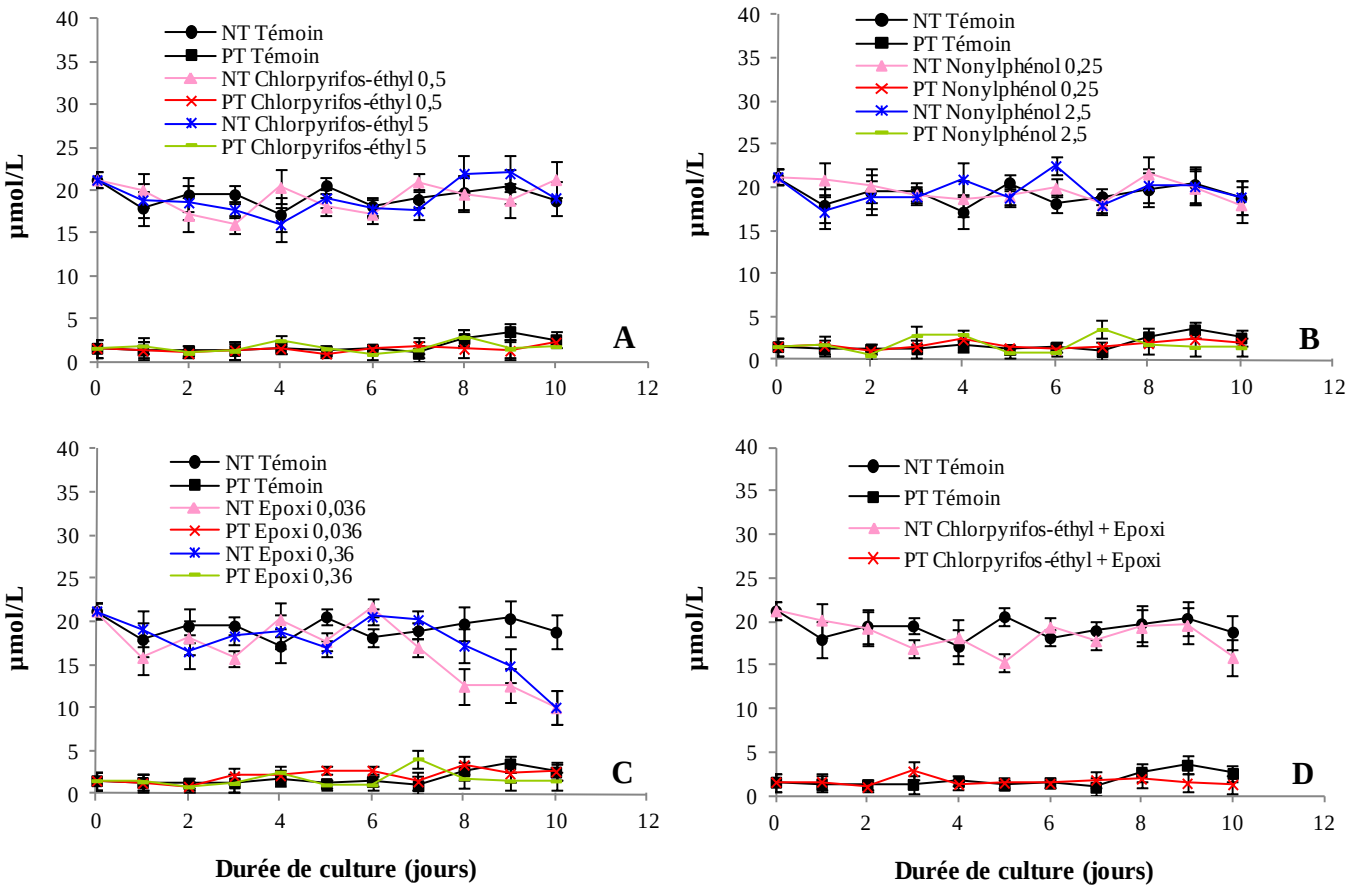


Figure 38 A, B, C, D : *Cinétique de l'évolution des teneurs totales en azote total (NT) et en phosphore (PT) en présence des différents contaminants ajoutés dans les microcosmes.* ***A)*** *chlorpyriphos-éthyl (Dursban) ;* ***B)*** *nonylphénol ;* ***C)*** *époxiconazole (Opus) ;* ***D)*** *chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole. Résultats exprimés en µmol/L ± ES.*

La présence dans l'eau de mer de chlorpyriphos-éthyl (Dursban) (Figure 38A), du mélange chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole (Figure 38D) ou du nonylphénol (Figure 38B) n'affecte que très peu l'évolution de la teneur en phosphore et en azote total.

En revanche, l'époxiconazole (Opus), aux deux concentrations testées, produit à partir du 8ème jour de culture une diminution de la teneur en azote total qui ne constitue plus que 47 % de celle du témoin après 10 j de culture (Figure 38C).

3.2. Action sur la teneur en $Si(OH)_4$

La teneur en acide silicique dans les microcosmes évolue peu au cours du temps, oscillant autour d'une valeur moyenne de 15,45 µmol/L (Figure 39).

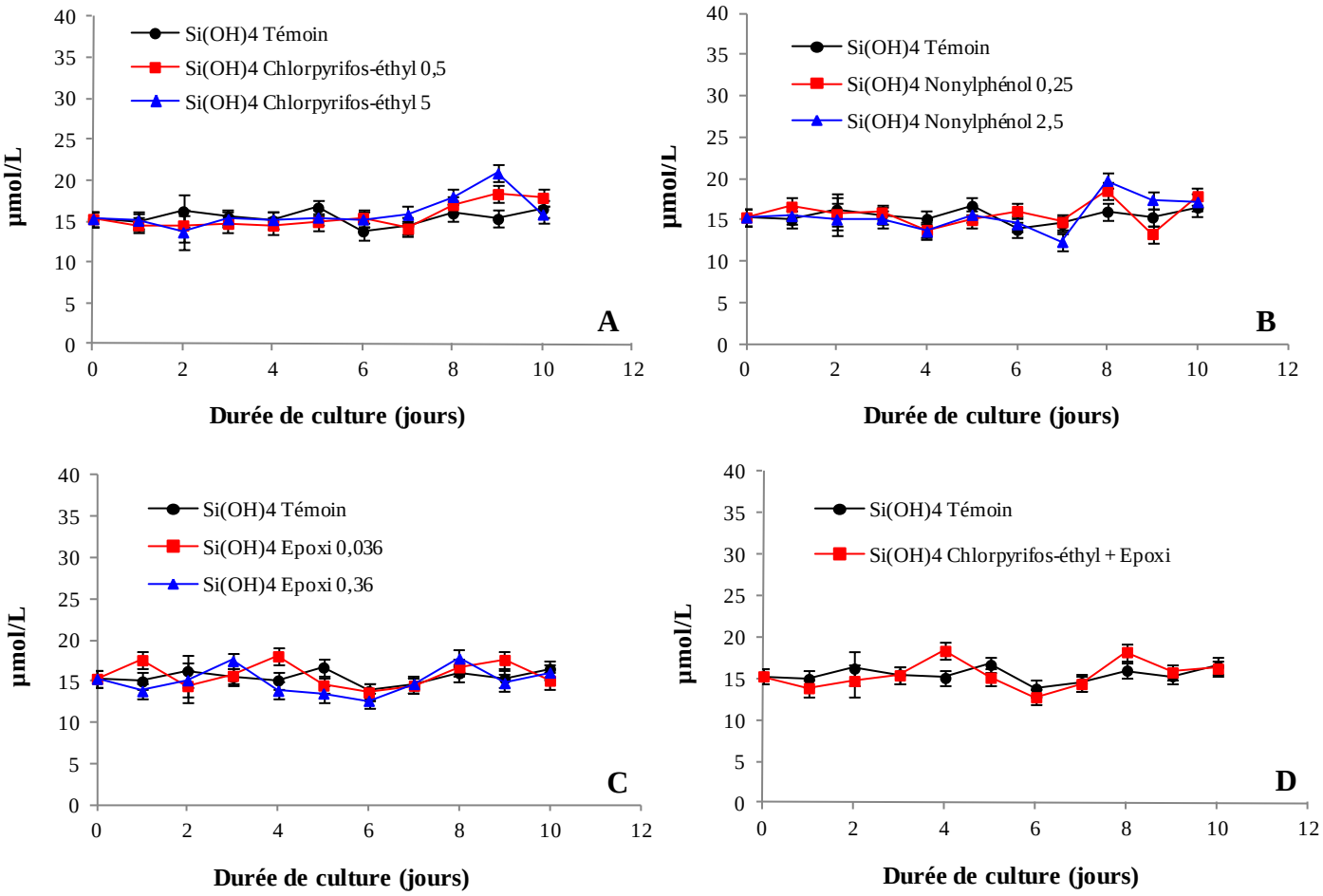


Figure 39 A, B, C, D : *Cinétique de l'évolution de la teneur en acide silicique ($SiOH_4$) en présence des différents contaminants ajoutés dans les microcosmes.* ***A)*** *chlorpyriphos-éthyl (Dursban);* ***B)*** *nonylphénol;* ***C)*** *époxiconazole (Opus) ;* ***D)*** *chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole. Résultats exprimés en µmol/L ± ES.*

L'ajout des différents contaminants : chlorpyriphos-éthyl (Figure 39A), nonylphénol (Figure 39B), époxiconazole (Figure 39C), ou mélange chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole (Figure 39D), n'entraîne aucun changement important de la teneur en acide silicique dans les microcosmes.

II. Effet des contaminants sur la croissance de *K. selliformis*

L'évolution de la population naturelle de *K. selliformis* en microcosmes a été étudiée en présence de trois contaminants pendant 11 j.

1. Effet du chlorpyriphos-éthyl (Dursban)

Dans le microcosme témoin, la population naturelle de *K. selliformis*, initialement de 400 000 cellules/L, montre une augmentation de la densité cellulaire pendant les quatre premiers jours de culture où elle atteint 711 200 cellules/L (Figure 40). Ensuite, le nombre de cellules diminue progressivement au cours du temps et, à partir du 9ème j, le nombre de cellules devient 20 à 40 fois moins important que celui enregistré à T_0, à savoir des densités comprises entre 9 000 à 19 000 cellules/L.

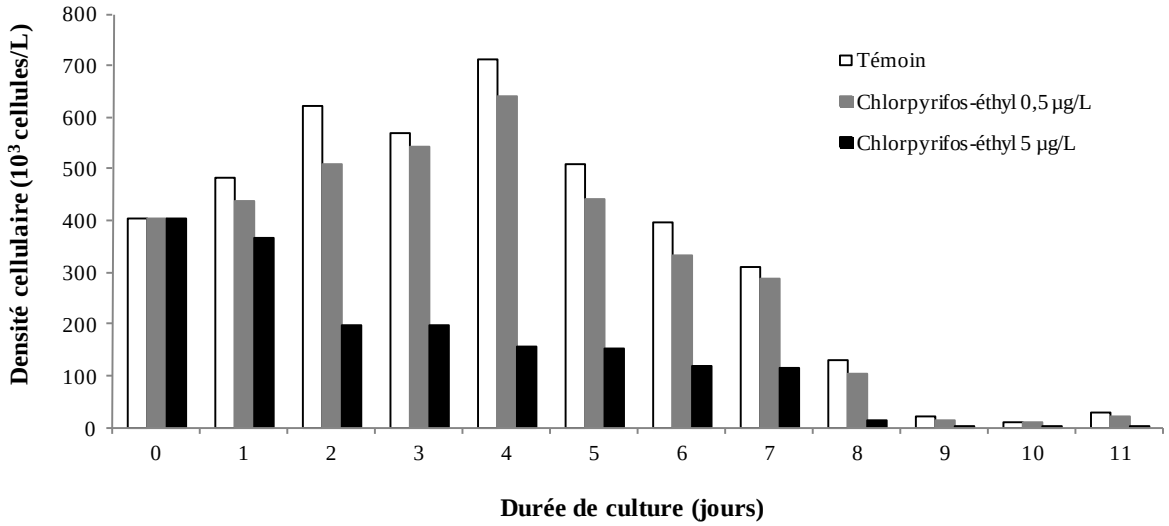


Figure 40 : *Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence du chlorpyriphos-éthyl (Dursban). Résultats exprimés en milliers de cellules/L.*

Lorsque le chlorpyriphos-éthyl est ajouté dans l'eau de mer à la concentration de 0,5 µg/L, il induit dès le premier jour, une inhibition de la croissance du dinoflagellé qui

se maintient tout au long de la culture, oscillant entre 5 et 31 % (Figure 40). A une concentration 10 fois plus élevée, l'insecticide produit une diminution importante de la densité cellulaire qui se dessine dès le premier jour de la culture (Figure 40). Au 2ème jour de culture, on observe une chute importante de la densité cellulaire (196 600 cellules/L), suivie par une décroissance régulière jusqu'au 7ème jour et ensuite une disparition progressive du dinoflagellé.

2. Effet de l'époxiconazole (Opus)

A la concentration de 0,036 µg/L, l'époxiconazole induit une stimulation de la division cellulaire de *K. selliformis*, manifeste dès le premier jour de culture et qui se maintient pendant les six jours suivants (Figure 41). En revanche, lorsque l'époxiconazole est ajouté à la concentration de 0,36 µg/L, il produit une réduction importante de la densité cellulaire qui chute dès le 1er jour à 144 080 cellules/L. Cette densité tend à diminuer pendant les cinq jours suivants et, à partir du 7ème jour, se produit un déclin rapide de la population de *K. selliformis*.

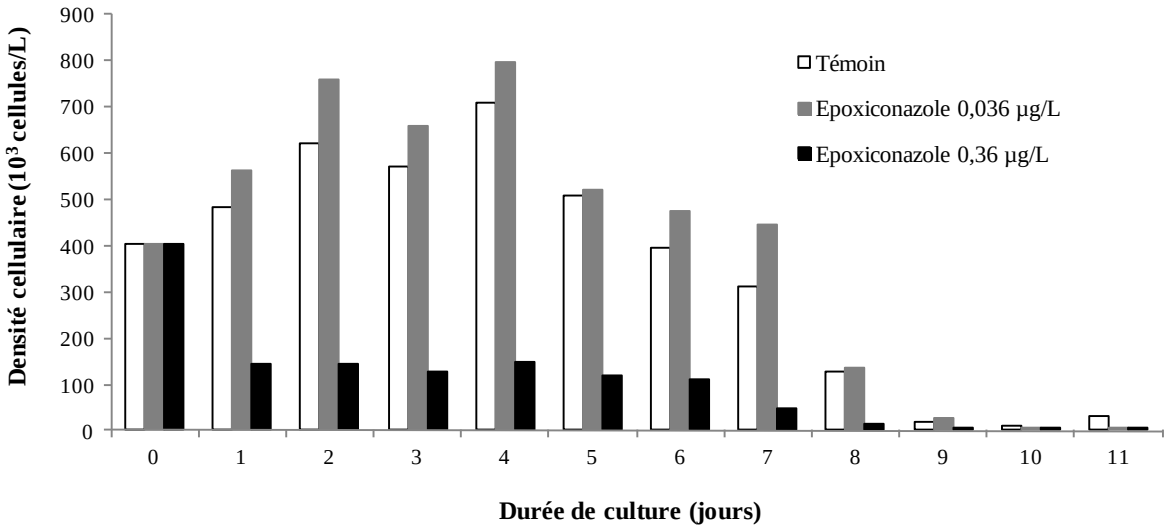


***Figure 41** : Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en milliers de cellules/L.*

3. Effet du nonylphénol

Lorsque le nonylphénol est ajouté dans l'eau de mer, il produit une diminution importante de la densité cellulaire du dinoflagellé (Figure 42). Evidente dès le 1er j de

traitement, cette réduction de la densité initiale se maintient tout au long de la culture et est fonction de la concentration en nonylphénol. C'est ainsi qu'après 6 j de traitement, on observe en présence de 0,25 µg/L et de 2,5 µg/L de nonylphénol, des densités qui sont respectivement de 165 900 et 120 380 cellules/L, constituant ainsi 42 % et 30 % de la densité du témoin à 6 j et seulement 41 % et 30 % de la densité initiale.

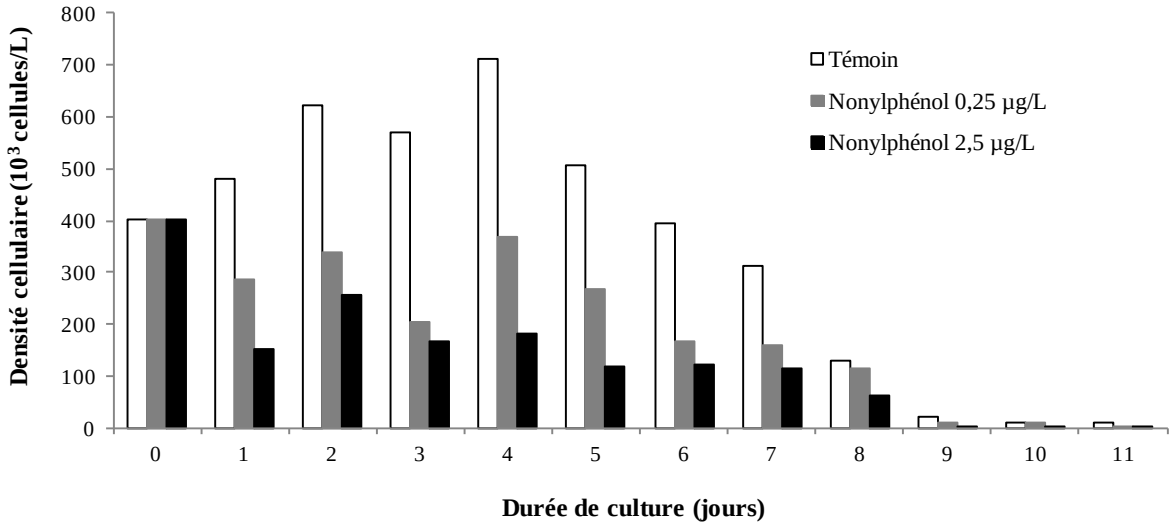


Figure 42 *: Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence de nonylphénol. Résultats exprimés en milliers de cellules/L.*

4. Effet du mélange chlorpyriphos-éthyl (Dursban) + époxiconazole (Opus)

Les résultats de la figure 43 montrent que la présence dans le microcosme du mélange : chlorpyriphos-éthyl (0,5µg/L) + d'époxiconazole (0,036 µg/L) produit une réduction drastique de la densité cellulaire de *K. selliformis*.

Dès le premier jour de culture, la densité cellulaire chute brutalement et, malgré une augmentation régulière jusqu'au 4ème jour, reste très inférieure à celle du témoin tout au long de la culture. Ainsi, à 4 j de culture, on observe en présence des deux pesticides, une densité de 140 000 cellules/L qui constitue 20 % de celle du témoin à 4 j et seulement 35 % de la densité initiale de la culture.

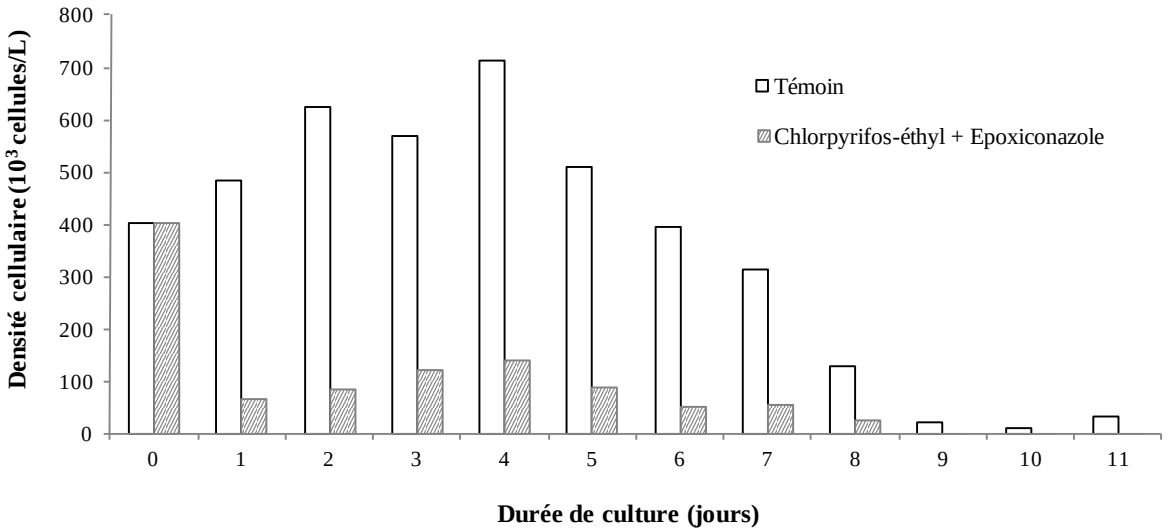


***Figure 43** : Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence du mélange : 0,5µg/L de chlorpyriphos-éthyl (Dursban) + 0,036 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en milliers de cellules/L.*

III. Effet des contaminants sur la communauté de diatomées

Une étude de l'action des contaminants sur la communauté des diatomées présente dans l'eau de mer provenant du golfe de Gabès a été effectuée. Le dénombrement des espèces présentes au début de l'expérience a montré que l'ensemble des diatomées ne représente que $1/10^5$ de la population du dinoflagellé *K. selliformis*.

En l'absence de tout traitement, le nombre total des différentes espèces de diatomées cultivées en microcosmes, augmente au cours du temps pour atteindre une densité maximale de 8 400 cellules/L à 5 j de culture, ce qui représente un doublement de la densité initiale (Figure 44). A partir du 6ème j la densité cellulaire des diatomées diminue progressivement et tombe à 200 cellules au 11ème j.

1. Effet du chlorpyriphos-éthyl (Dursban)

La présence de 0,5 µg/L de chlorpyriphos-éthyl dans le microcosme produit une stimulation de la croissance, visible dès le premier jour (+ 31 %) et qui persiste jusqu'au 11ème j de la culture (Figure 44). A l'opposé l'augmentation de la concentration du chlorpyriphos-éthyl à 5 µg/L, se traduit par une inhibition de la croissance des

diatomées, surtout importante à partir du 5ème jour de culture, accélérant ainsi le déclin de la population qui se produit naturellement.

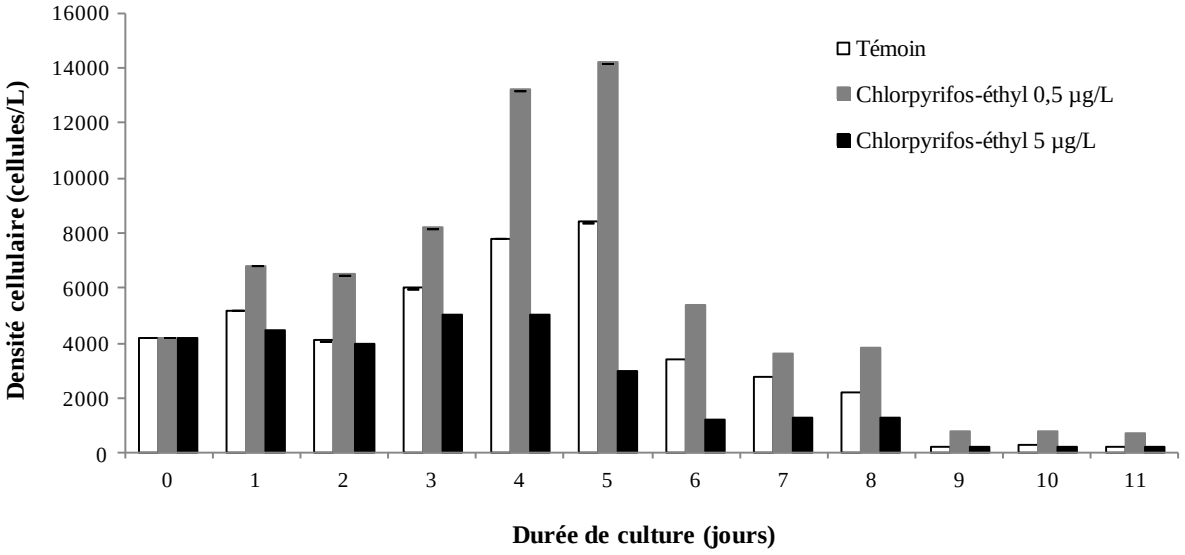


***Figure 44** : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence de chlorpyriphos-éthyl (Dursban). Résultats exprimés en nombre de cellules/L.*

2. Effet de l'époxiconazole (Opus)

L'ajout d'époxiconazole à la concentration de 0,036 µg/L produit une stimulation de la croissance des diatomées qui est de 27, 41 et 30 % respectivement au 1er ,2ème et 3ème jour de culture et qui diminue ensuite (Figure 45).

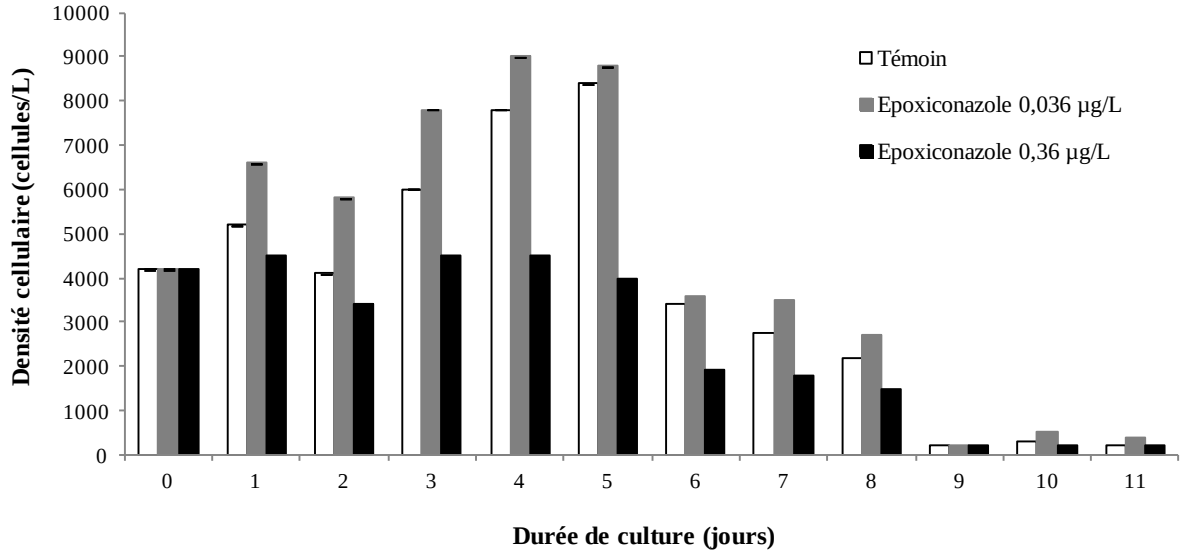


***Figure 45** : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en nombre de cellules/L.*

Lorsque l'époxiconazole est ajouté à la concentration de 0,36 µg/L, il en résulte une inhibition immédiate de la croissance, maximale à 4-5 jours de culture, avec respectivement 42 et 52 % d'inhibition ; cette inhibition disparaît totalement en fin de culture (9-11 j).

3. Effet du nonylphénol

Les résultats de la figure 46 montrent que le nonylphénol, ajouté dans le microcosme, affecte la croissance des diatomées. A la concentration de 0,25 µg/L, cet adjuvant stimule la division des diatomées pendant les cinq premiers jours de culture, produisant un doublement de la population au 2ème jour. Cette stimulation disparaît ensuite lorsque la phase de déclin de la population se met en place, à partir du 6ème jour.

L'ajout à l'eau de mer de nonylphénol, à la concentration de 2,5 µg/L, empêche pendant les quatre premiers jours, la mise en place de l'augmentation de la population qui se produit naturellement. A partir du 5ème j, le nonylphénol (2,5 µg/L) réduit fortement la densité cellulaire (- 62 %), et amorce le déclin de la population de diatomées ; cette action inhibitrice ne disparaît qu'à partir du 10ème j de culture.

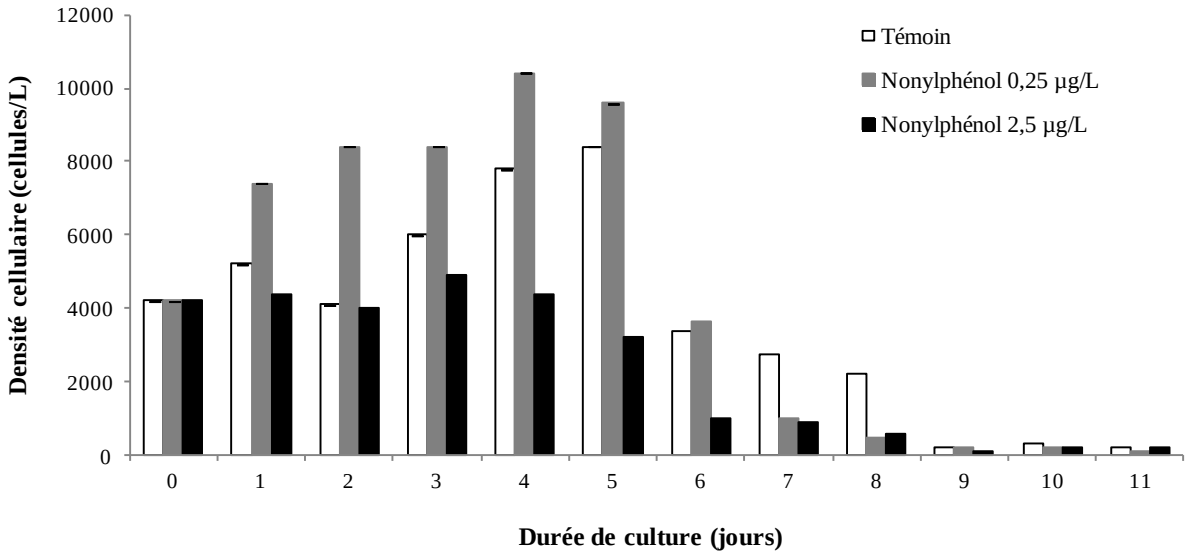


***Figure 46** : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence de nonylphénol. Résultats exprimés en nombre de cellules/L.*

4. Effet du mélange chlorpyriphos-éthyl (Dursban) + époxiconazole (Opus)

La présence dans l'eau de mer du chlorpyriphos-éthyl et de l'époxiconazole en mélange, augmente considérablement le nombre de diatomées dans les microcosmes (Figure 47). Cette stimulation, qui se maintient tout au long de la culture, est visible dès le 1er j (+ 23 %) et atteint son maximum au 3ème j (+ 170 %).

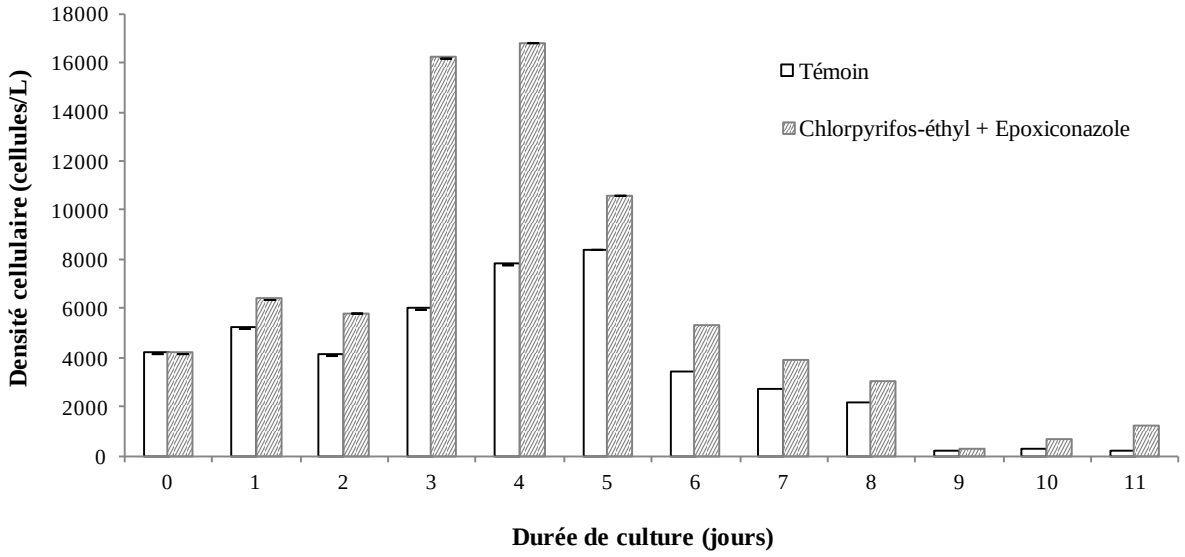


***Figure 47** : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du mélange : 0,5 µg/L de chlorpyriphos-éthyl (Dursban) et 0,036 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en nombre de cellules/L.*

IV. Discussion

Le dénombrement et l'identification des espèces phytoplanctoniques présentes dans l'eau de mer provenant de la lagune de Boughrara (golfe de Gabès), réalisés en décembre 2008, montrent que la communauté phytoplanctonique est composée majoritairement (99 %) par le dinoflagellé toxique *Karenia selliformis.* En effet, ce prélèvement a été effectué pendant une période marquée par un épisode de bloom de cette algue. Des efflorescences répétées du phytoplancton toxique *Gymnodinium* sp, identifié comme étant *Karenia selliformis* (Hansen *et al*., 2004), sont observées dans cette région (Hamza et Elabed, 1994 ; Hamza *et al.*, 1999 ; Drira *et al.,* 2008 ; Feki *et al*., 2008).

La culture de communautés naturelles en microcosmes au laboratoire met en évidence une augmentation progressive de la densité cellulaire des dinoflagellés, essentiellement *K. selliformis,* et des diatomées, marquant un pic à 4-5 j de culture suivi d'une diminution jusqu'au 11 ème jour. Cependant, l'ensemble des diatomées reste minoritaire puisque sa densité reste 10^5 fois inférieure à celle de *K. selliformis.* Ceci s'accorde avec les données de Rejeb-Jenhani et Romdhane (2002) qui rapportent, un fort développement observé *in situ,* de la classe des Dinophycées par rapport à celle des Diatomophycées lors de blooms phytoplanctoniques consécutifs à l'eutrophisation des eaux de la lagune de Boughrara. La similitude des résultats permet de valider l'utilisation du système microcosme pour étudier l'action des contaminants. L'inhibition de la croissance des diatomées qui est observée est vraisemblablement due à l'action de la toxine gymnodimine produite par *Karenia* (Gentien et Arzul, 1990 ; Seki *et al*., 1995 ; Hoe Chang, 2011) et connue pour altérer les communautés phytoplanctoniques (Partensky et Vaulot, 1991 a ; Arzul *et al*., 1993).

L'addition de contaminants aux communautés naturelles en microcosmes montre que d'une manière générale quel que soit le contaminant utilisé : chlorpyriphos-éthyl (Dursban), époxiconazole (Opus) ou nonylphénol, ajoutés isolément ou en mélange, une diminution de la proportion de *K. selliformis* est observée. Cet abaissement se réalise, après 11 j d'exposition au chlorpyriphos-éthyl (0,5 µg /L), au profit essentiellement des diatomées dont la proportion s'élève à 9 %, comparativement à 1-2 % chez le témoin. Un accroissement du taux de diatomées (14 à 38 %) est également observé en présence

d'époxiconazole (0,036 µg/L), de nonylphénol (0,25 µg/L, de chlorpyriphos-éthyl (5 µg/L) ou du mélange époxiconazole + chlorpyriphos-éthyl et est accompagné d'une nette augmentation de la proportion des dinoflagellés autres que *Karenia* (16 à 35 % / 2 % chez le témoin), avec en présence de nonylphénol et du mélange des deux pesticides une prépondérance de *K. veneficum ;* cet effet étant observable dès 6 j de traitement avec les deux pesticides. Lors de l'exposition à une plus forte concentration en nonylphénol (2,5 µg/L), la diminution du pourcentage de *K. selliformis* se réalise majoritairement au profit de *K. veneficum.* Cet effet, visible dès 6 j de culture, s'accentue avec la durée du traitement puisque le taux de *K. veneficum* évolue de 21 % à 96 % de la population algale, ce dinoflagellé devenant ainsi l'espèce majoritairement présente dans le microcosme à 11 j de culture.

Ces résultats montrent donc que les différents contaminants utilisés modifient les proportions relatives des différents organismes constituant la communauté phytoplanctonique analysée. L'examen de l'évolution des densités de ces organismes montre que, à faibles concentrations, le chlorpyriphos-éthyl, l'époxiconazole ou le nonylphénol stimulent la croissance des diatomées mais la densité cellulaire de *K. selliformis* demeure peu modifiée voire diminuée (nonylphénol). Le mélange époxiconazole + chlorpyriphos-éthyl induit également une très nette stimulation de la croissance des diatomées mais produit une très forte réduction de la densité de *K. selliformis*. Utilisés à fortes concentrations, les deux pesticides ou l'adjuvant réduisent à la fois la croissance des diatomées et celle de *K. selliformis*.

Ces résultats montrent que les réponses d'une communauté ne sont pas dépendantes de la sensibilité d'un seul des organismes. Elles résultent de la combinaison des différentes sensibilités à un composé biologiquement actif. De nombreux exemples ont été rapportés tant pour des microcosmes que pour des mésocosmes. Ainsi, en eau douce, la toxicité du chlorpyriphos vis-à-vis du zooplancton s'accompagne d'une augmentation du phytoplancton (Hurlbert *et al*., 1972 ; Papst et Boyer, 1980 ; Brock *et al*., 1992 ; Fleeger *et al*., 2003 ; Van Wijngaarden *et al*., 2005). Cet effet est retrouvé lorsque deux insecticides (chlorpyriphos + lindane) ou un herbicide (atrazine) + un insecticide (lindane) ou un seul insecticide (cyperméthrine) sont ajoutés au microcosme (Van den Brink *et al*., 2002 ; Friberg-Jensen *et al*., 2003 ; Van den Brink *et al*., 2009). Peu de

données existent concernant le milieu marin ; cependant en eau moyennement salée, la suppression par le chlorpyriphos du zooplancton coïncide avec un bloom d'*Anabaena flos-aquae* (Simon *et al*., 1995).

Pour rendre compte de la stimulation de croissance des diatomées observée en présence de faibles concentrations de contaminants, on peut invoquer un phénomène d'hormèse qui permet une accélération du taux de croissance lorsque le stress imposé est relativement faible (Stebbing, 1998b). Cependant, en présence du mélange des deux pesticides, bien qu'utilisés tous deux à faible concentration, une forte stimulation de la croissance des diatomées coïncide avec la réduction de croissance de *K. selliformis*. Selon Partensky *et al*. (1991 b), les toxines produites par les dinoflagellés sont capables d'inhiber la multiplication des autres espèces et une réduction de la croissance des dinoflagellés par les contaminants pourrait alors permettre une meilleure croissance des autres organismes du microcosme ; un travail récent a souligné l'effet cytotoxique de la gymnodimine produite par *K. selliformis* vis-à-vis des diatomées (Hoe Chang, 2011). Venant étayer cette hypothèse, il y a le fait qu'à l'issue des 11 j d'expérience en présence de la forte concentration en nonylphénol, le dinoflagellé *K. veneficum* est devenu l'algue dominante, présente à 97 % dans le microcosme. La quasi-élimination des autres espèces pourrait également résulter de la production par ce dinoflagellé des toxines karlotoxines dont la structure a récemment été établie (Bachvoroff *et al*., 2009 ; Peng *et al*., 2010 ; Van Wagoner *et al*., 2010) et dont les effets cytotoxiques ont été montrés par Deeds *et al*. (2002).

Après une nette diminution au cours des premières 24 h de mise en culture, la teneur en chlorophylle a dans les microcosmes évolue peu jusqu'à 7 j pour diminuer ensuite avec la chute des densités cellulaires des diatomées et de *K. selliformis*. La participation des dinoflagellés dans la teneur en pigment est vraisemblablement prépondérante, compte tenu d'une part, de leur densité élevée comparativement à celle des diatomées et, d'autre part, de la taille relativement importante qui les caractérise. En effet, dans des travaux récents, des tailles de 20-32 µm de longueur et 16-32 µm de largeur sont rapportées pour *K. selliformis* et, de 9-18 µm de longueur et 7-14 µm de largeur pour *Karlodium veneficum* (Haywood *et al.*, 2004 ; Bergholtz *et al*. (2005).

L'addition au microcosme de l'un ou l'autre des contaminants induit une diminution immédiate et progressive de la teneur de ce pigment, variant de 30 à 50 % et qui atteint 76 % en présence du mélange chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole. De façon analogue, Porsbring *et al* (2009) ont mis en évidence une réduction de la chlorophylle a dans une communauté micro-algale sous l'effet d'un fongicide imidazole, le clotrimazole. Les inhibitions qui persistent jusqu'au 10ème j de culture résultent vraisemblablement de l'inhibition de la densité cellulaire de *K. selliformis* qui doit participer pour une large part à la variation de teneur en chlorophylle a . Le léger effet stimulateur produit par l'époxiconazole, à la concentration de 0,036 µg/L, sur la croissance de *K. selliformis* est associé à une absence d'effet sur la teneur en chlorophylle a, et vient donc appuyer l'hypothèse d'une participation majoritaire du dinoflagellé dans la teneur en pigment.

Par ailleurs, le suivi de l'évolution des concentrations en phosphore et nitrate dans les microcosmes, en présence ou non des contaminants testés, ne montre pas de variations hormis une diminution de la teneur en azote total en fin de culture, en présence d'époxiconazole. Ceci montre que les sels nutritifs ne sont pas limitants pour la croissance des microalgues présentes et ne peuvent rendre compte de la baisse de chlorophylle a qui est observée.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'effet des contaminants chimiques sur la composition phytoplanctonique d'un milieu naturel, le golfe de Gabès, pendant un épisode bien particulier marqué par un bloom de l'algue toxique *K. selliformis* et les résultats montrent que les différents traitements testés affectent différemment la composition phytoplanctonique. Ceci s'accorde avec des travaux antérieurs qui démontrent un effet variable des pesticides sur la composition des communautés phytoplanctoniques naturelles (Pelte 1995 ; Caux et Kent, 1995 ; Bérard *et al.* 1999 ; Leboulanger *et al.,* 2001 ; Mohr *et al*., 2008), effet qui s'avère fonction des conditions du milieu, de la composition initiale des peuplements et des interactions entre chacun de ces organismes (Bérard et Pelte, 1999).

CHAPITRE V

EFFET DES CONTAMINANTS CHIMIQUES SUR LES ANIMAUX MARINS

I. Etude de la toxicité des contaminants sur les différents modèles animaux

1. Effet sur le développement embryo-larvaire de l'oursin (*P. lividus*)

Une évaluation de l'effet des quatre contaminants sur le développement embryo-larvaire de l'oursin, appliqués pendant 48 h immédiatement après fécondation, a été réalisée. Le tableau 20 rapporte les effets inhibiteurs de ces composés. Le cuivre et le nonylphénol présentent les toxicités les plus faibles, équivalentes avec des CSEO respectivement de 5,06 et 6,76 µg/L et des CE_{50} de 12,1 et 12,2 µg/L. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour l'époxiconazole avec une CSEO (1 428 µg/L) et une CE_{50} (2 456 µg/L), c'est à dire 96 et 73 fois supérieures à celles observées pour la formulation commerciale Opus (CSEO 14,8 µg/L et CE_{50} 33,5 µg/L).

Tableau 20 : Valeurs des CSEO et CE_{50} pour quatre contaminants sur la taille des *plutei*. Mesures après 48 h d'exposition des œufs à l'époxiconazole, l'Opus, le nonylphénol ou au cuivre. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Epoxiconazole	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CSEO	1 428 ± 99,2	14,8 ± 2,73	5,06 ± 0,98	6,76 ± 1,85
CE_{50}	2 456 ± 55,7	33,5 ± 3,74	12,1 ± 0,45	12,2 ± 1,13

2. Effet des contaminants sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse *(C. gigas)*

2.1. Détermination des CSEO et CE_{50}

Une étude de l'action des trois contaminants a été réalisée sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse : le sulfate de cuivre utilisé comme toxique de référence dans cette étude, l'Opus et le nonylphénol. L'exposition de 24 h à ces molécules chimiques, dans les 15 mn qui suivent la fécondation réalisée en eau de mer de référence, produit des inhibitions du développement embryo-larvaire, variables selon la nature du composé appliqué.

L'adjuvant nonylphénol et le cuivre (résultats exprimés en ion cuivre) présentent des toxicités équivalentes, avec respectivement des CSEO de 9,11 et 7,75 µg/L et des CE_{50} de 20,9 et 18,3 µg/L alors que le fongicide époxiconazole, sous sa formulation commerciale Opus, se révèle 1,45 à 1,75 fois moins toxique, avec une CSEO de 13,2 µg/L et une CE_{50} de 32,2 µg/L (Tableau 21).

Tableau 21 : Valeurs des CSEO et CE_{50} mesurées après 24 h d'exposition aux trois contaminants, sur le développement embryo-larvaire. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CSEO	13,2 ± 1,44	7,75 ± 1,67	9,11 ± 2,43
CE_{50}	32,2 ± 2,24	18,3 ± 1,85	20,9 ± 1,45

2.2. Effet des contaminants sur le pourcentage brut d'anomalies

Chez les lots témoins, le taux de larves 'D' normales est de 96,8 % ce qui correspond au minimum de 80 % préconisé dans la norme AFNOR T90 XP-283 (2009). Les anomalies observées portent essentiellement sur le manteau et la coquille.

2.2.1. Effet de l'Opus

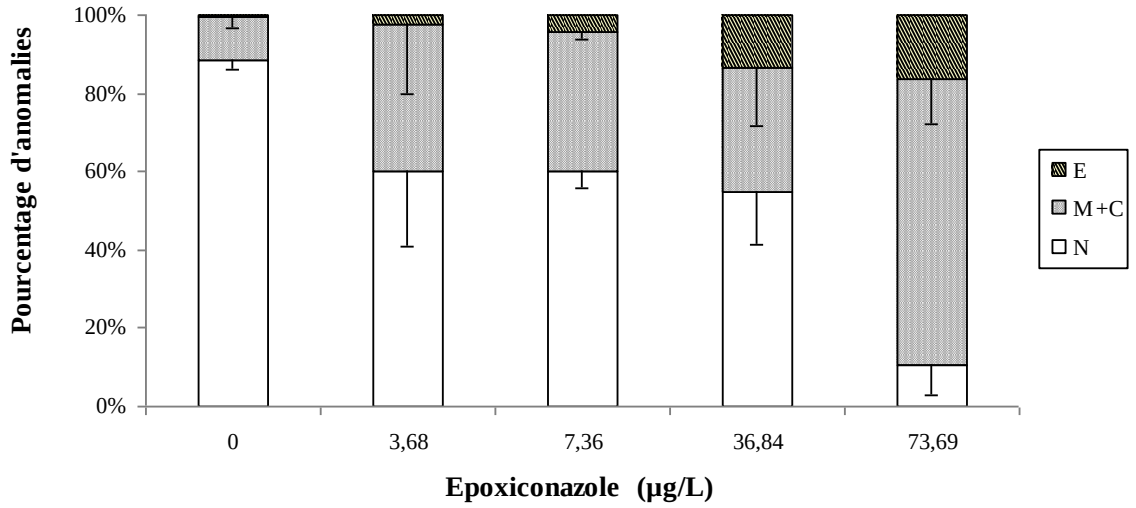


Figure 48 *: Effet de la concentration en époxiconazole de l'Opus (moyenne ± IC 95 %), appliqué dès fécondation pendant 24 h, sur le taux des différentes anomalies de C. gigas : du manteau et de la coquille (M+C), de l 'embryon (E). Larves normales (N).*

Aux concentrations de 3,68, 7,36 et 36,84 µg/L, l'Opus induit de 36 à 38 % d'anomalies du manteau et de la coquille (M+C) et ce taux s'élève ensuite à 73 % lorsque la concentration en fongicide utilisée est de 73,69 µg/L (Figure 48). Parallèlement, le taux de blocage au stade embryon (E) augmente progressivement, s'élevant de 2 % à 17 % et, après traitement des œufs à la concentration en Opus de 73,69 µg/L, seuls 10 % de larves normales (N) sont observés.

2.2.2. Effet du nonylphénol

La figure 49 montre que le nonylphénol induit une augmentation du taux d'anomalies du manteau + coquille (M+C) qui s'établit à 12 et 13 % aux concentrations de 5 et 12,5 µg/L. Ce taux s'élève ensuite, évoluant de 44 % en présence de 25 µg/L à 88 % avec 50 µg/L. Parallèlement, un accroissement du pourcentage des blocages au stade embryon est observé à la concentration 50 µg/L, il s'élève à 12 % et ceci se traduit par un effet toxique drastique avec toutes les autres larves anormales et aucune larve 'D' normale.

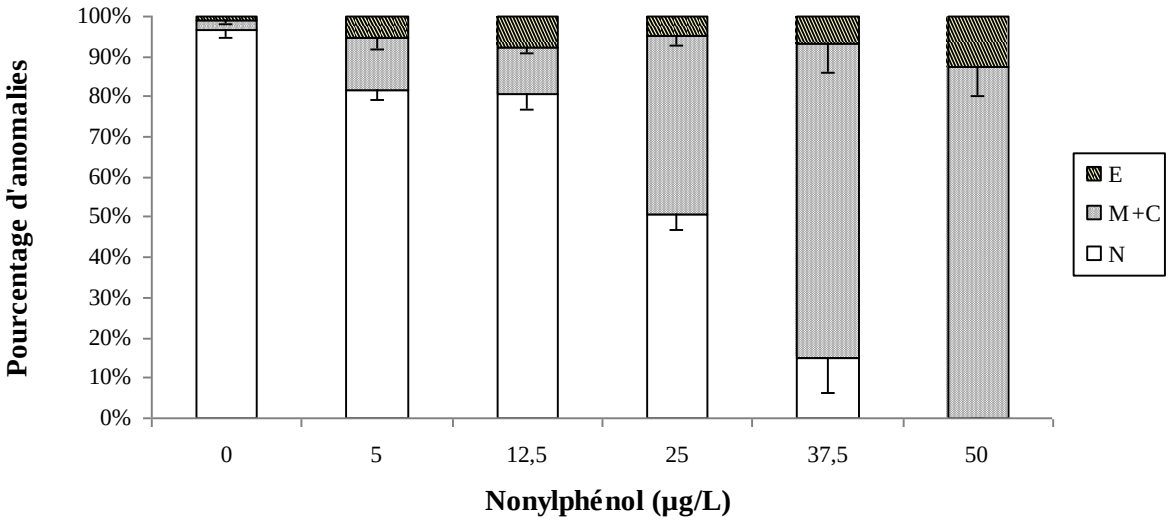


Figure 49 *: Effet de la concentration en nonylphénol (moyenne ± IC 95 %), appliqué dès fécondation pendant 24 h, sur le taux des différentes anomalies de C. gigas : du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E) ; Larves normales (N).*

2.2.3. Effet du cuivre

L'exposition du développement embryo-larvaire de *C. gigas* au sulfate de cuivre induit un pourcentage d'anomalies du manteau + coquille (M+C) qui, de 9 % en présence de 8 µg d'ion cuivre/L, s'élève à 30 % pour une exposition à 24 µg/L (Figure 50). A la concentration de 32 µg/L, aucune larve normale ne se développe ; on observe en effet 96 % d'anomalies M+C et 4 % des larves sont bloquées au stade embryon. Ces valeurs sont compatibles avec la fourchette proposée par la norme AFNOR T90 XP-283.

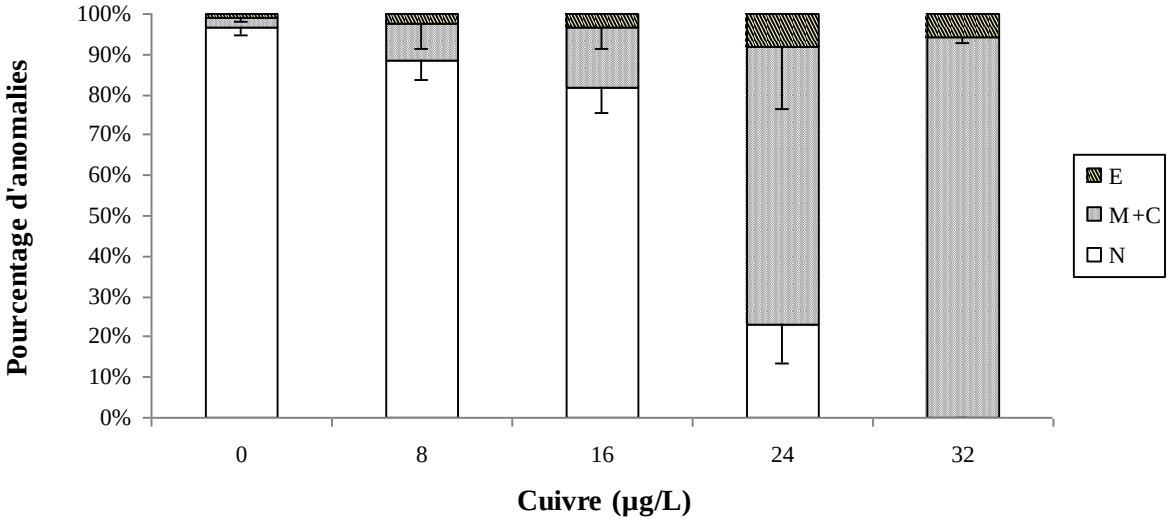


Figure 50 *: Effet de la concentration en ion cuivre (moyenne ± IC 95 %), appliqué dès fécondation pendant 24 h, sur le taux des différentes anomalies de C. gigas : anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).*

3. Etude de la toxicité des contaminants sur la palourde japonaise (*R. philippinarum*)

L'effet de quatre contaminants chimiques (époxiconazole, nonylphénol, Opus et cuivre), a été évalué sur trois stades du développement de la palourde : embryo-larvaire, métamorphose et croissance du naissain. Ces stades représentent trois périodes critiques et décisives dans le développement du bivalve et l'exposition de l'animal aux contaminants pendant ces trois stades permet de déterminer la phase la plus sensible du développement de *R. philippinarum*.

3.1. Effet sur le développement embryo-larvaire

3.1.1. Détermination des CSEO et CE_{50}

Le tableau 22 rapporte les valeurs de CSEO et CE_{50} calculées pour chaque contaminant testé et fait apparaître une gradation dans les inhibitions du développement embryo-larvaire produites par les différents composés. Ainsi, l'adjuvant nonylphénol et le toxique de référence (le cuivre) dont les valeurs de CSEO et CE_{50} sont basses et équivalentes respectivement à 1,32 et 1,26 µg/L pour les CSEO et 4,04 et 3,79 µg/L pour les CE_{50} s'avèrent les contaminants les plus toxiques en comparaison à l'époxiconazole qui avec une CSEO de 1 811 µg/L et une CE_{50} de 2 769 µg/L, est le moins toxique. Sous sa formulation commerciale Opus, l'époxiconazole présente une toxicité nettement accrue, avec une CSEO 364 fois plus faible (4,98 µg/L) et une CE_{50} 169 fois inférieure (16,3 µg/L) à celles observées avec la substance active elle même.

Tableau 22 : Valeurs des CSEO et CE_{50} mesurées après 48 h d'exposition des œufs de palourde aux quatre contaminants étudiés. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Epoxiconazole	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CSEO	1 811 ± 165,3	4,98 ± 1,86	1,26 ± 0,43	1,32 ± 0,76
CE_{50}	2 769 ± 172,2	16,3 ± 1,41	3,79 ± 0,16	4,04 ± 0,8

3.1.2. Effet des contaminants sur le pourcentage brut d'anomalies

3.1.2.1. Effet de l'époxiconazole

Aux concentrations de 100, 250, 500, 1 000 et 1 500 µg/l, l'époxiconazole (substance active) induit de 17,5 à 29,5 % d'anomalies du manteau + coquille (M+C) chez la

palourde et ce pourcentage augmente progressivement avec la concentration en fongicide pour atteindre 58 % après une exposition à 4 mg/l (Figure 51). D'autre part, jusqu'à une concentration de 2 mg/l, le taux de blocage au stade embryon (E) varie entre 0 et 4 % et atteint un taux de 30 % à la concentration de 4 mg/L d'époxiconazole ; pour la concentration de 8 mg/l, seulement 11 % de larves normales sont observés.

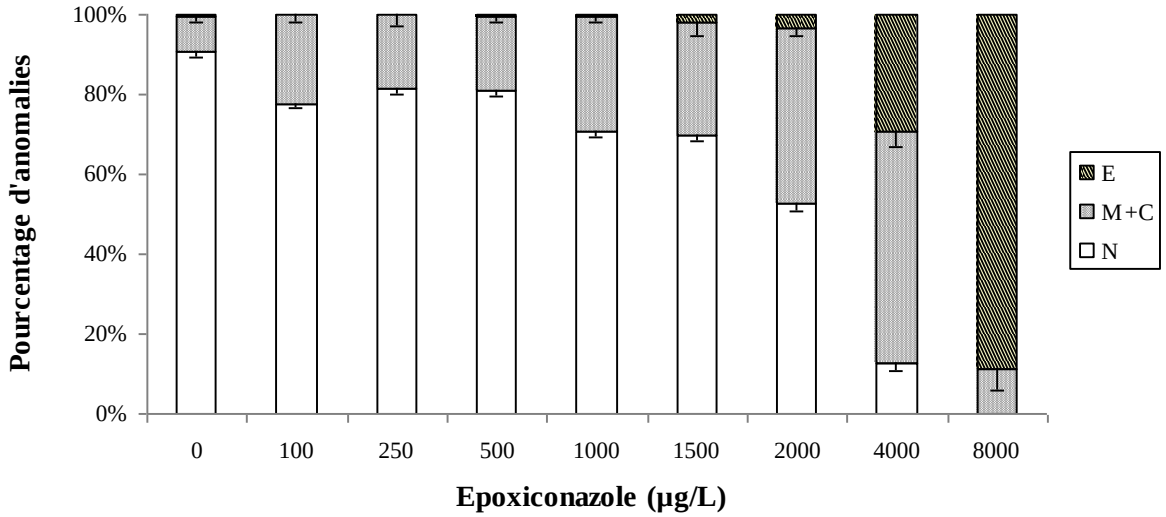


Figure 51 *: Taux des différentes anomalies de R. philippinarum en fonction de la concentration en époxiconazole appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).*

3.1.2.2. Effet de l'Opus

L'époxiconazole a été apporté également sous la formulation commerciale Opus. Le pourcentage d'anomalies du manteau + coquille (M+C), de 9 % chez le témoin, n'est pas significativement modifié par un traitement à l'Opus à la concentration de 3,68 µg/l (Figure 52). En revanche lorsque la concentration en fongicide appliqué est augmentée, on observe une élévation de ce taux d'anomalies de 19,75 % après exposition à 7,37 µg/L d'Opus, ce pourcentage s'élève à 49 % après traitement avec des concentrations de 14,74 et 22,1 µg/L du fongicide. A la concentration de 44,2 µg/L, le taux d'anomalies M + C diminue légèrement à la valeur de 37 % mais s'accompagne d'un taux de blocage des larves au stade embryon de 27 % ; en effet seuls 36 % des larves se développent normalement. Par la suite, le blocage des larves au stade embryon devient quasi-total (88,4 µg/L) voire total (176,8 µg/L).

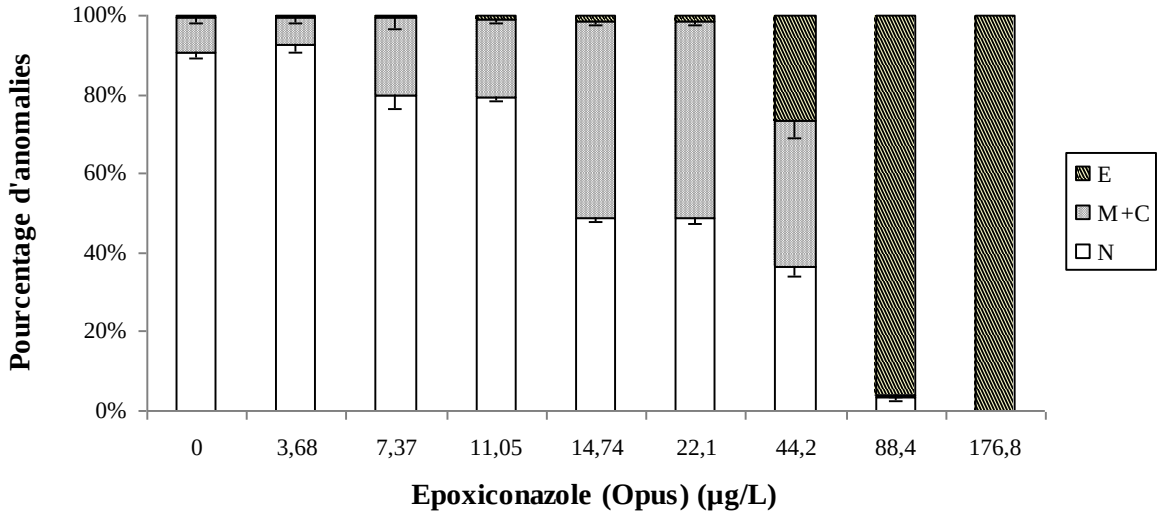


Figure 52 : *Taux des différentes anomalies de R. philippinarum en fonction de la concentration en époxiconazole de l'Opus appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).*

3.1.2.3. Effet du nonylphénol

Faiblement observé chez le témoin, le taux d'anomalies de 9 % du manteau + coquille (M + C), n'est que peu modifié par un traitement au nonylphénol à la concentration de 1,25 µg/L (Figure 53). En revanche, l'augmentation de la concentration s'accompagne d'un accroissement de ce taux d'anomalies. Ainsi, l'exposition à 2,5 µg/L en nonylphénol induit 16,5 % d'anomalies M + C et ce taux s'élève à 58 % après traitement par 10 µg/L. Parallèlement, dès la concentration de 3,75 µg/L, le nonylphénol produit un blocage du développement des larves au stade embryon qui va croissant avec la concentration de la substance pour atteindre 100 % dès la concentration de 15 µg/L.

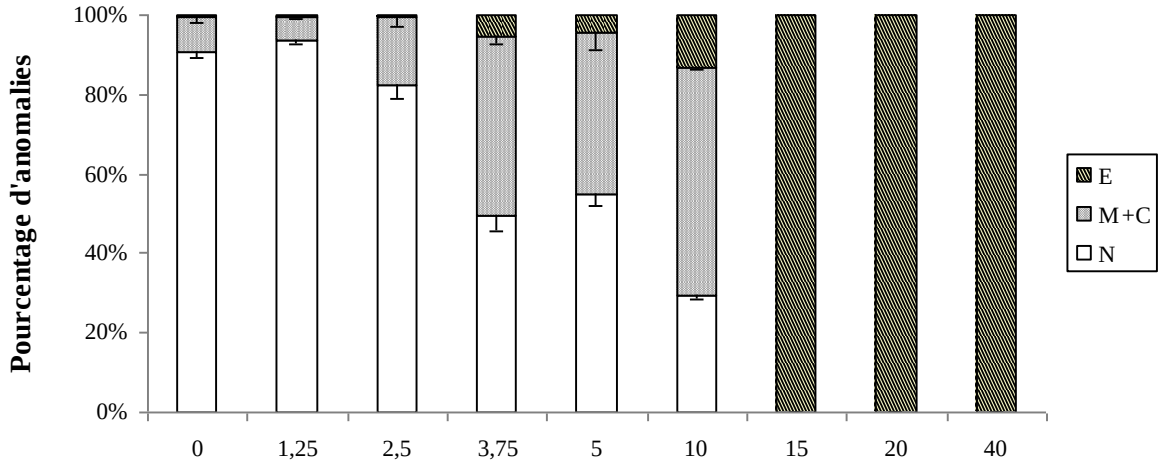


Figure 53 *: Taux des différentes anomalies de la palourde en fonction de la concentration en nonylphénol appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).*

3.1.2.4. Effet du cuivre

A la concentration de 1,2 µg/L, le sulfate de cuivre (exprimé en ion cuivre) induit une diminution légère mais significative du taux d'anomalies du manteau + coquille (M+C) cependant qu'apparaît un blocage de 1,25 % des larves au stade embryon (Figure 54). L'augmentation de la concentration en cuivre, entre 2,4 et 4,8 µg/L, produit un accroissement progressif du taux d'anomalies M +C qui s'élève de 27,75 % à 76 % et qui, conjugué au taux de blocage des larves au stade embryon, se traduit par une réduction progressive du taux de larves normales. A la concentration de 6 µg/L en cuivre, 98,5 % des larves sont bloquées au stade embryon.

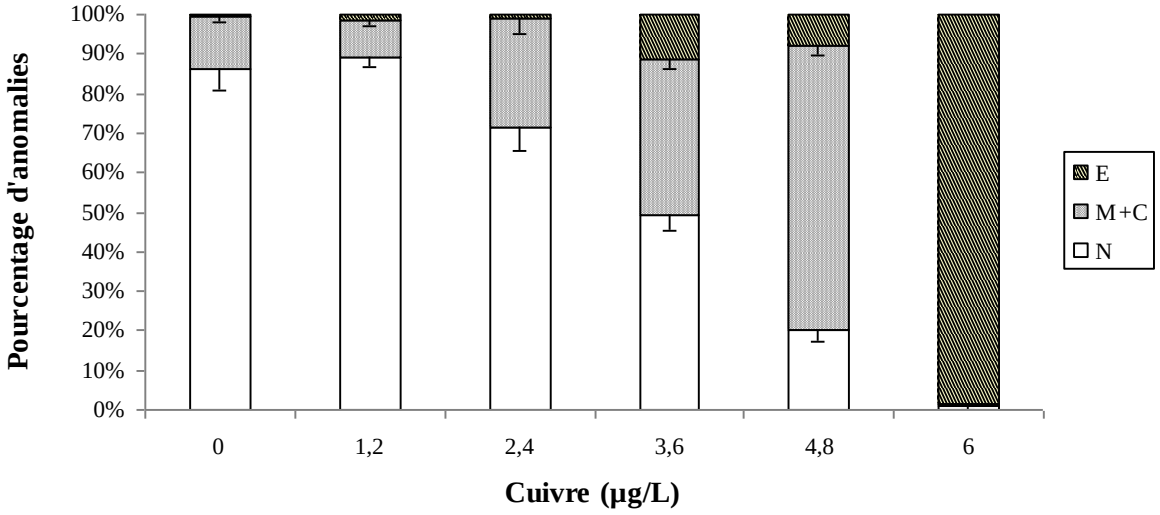


Figure 54 *: Taux des différentes anomalies de R. philippinarum en fonction de la concentration en ion cuivre appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).*

4. Effet sur la métamorphose des larves de la palourde (*R. philippinarum*)

L'étude de l'effet des contaminants sur la métamorphose de la palourde a été réalisée sur des individus en fin de vie larvaire (quatre semaines). La métamorphose a été induite par ajout d'épinéphrine dans l'eau de mer. Cent larves sont alors transférées dans chaque puits et traitées par les contaminants étudiés. Après une incubation de 48 h à 18 °C, un dénombrement des différents stades atteints par les larves (métamorphose complète, métamorphose incomplète, pas de métamorphose et mortes) est effectué pour déterminer l'effet inhibiteur ou non des contaminants sur la métamorphose. Complémentairement, un témoin positif en présence uniquement de l'inducteur de

métamorphose : épinéphrine et un témoin négatif, sans ajout d'épinéphrine, ont également été réalisés.

4.1. Détermination des CSEO et CE_{50}

Une inhibition de la métamorphose de la palourde est produite par les quatre contaminants étudiés. Bien que les valeurs de CE_{50} déterminées soient nettement inférieures à celles obtenues pour le bio-essai du développement embryo-larvaire, l'ordre de toxicité des contaminants s'avère identique (Tableau 23). En effet le nonylphénol et le cuivre constituent les molécules les plus toxiques, avec des CSEO de 0,13 - 0,62 µg/L et des CE_{50} de 1,90 - 1,98 µg/L. Légèrement moins inhibiteur que le nonylphénol et le cuivre, l'Opus présente une CSEO de 1,87 µg/L et une CE_{50} de 4,24 µg/L, valeurs 59 fois inférieures à celles observées pour la molécule pure d'époxiconazole qui constitue le contaminant le moins toxique, avec une CSEO de 109 µg/L et une CE_{50} de 252 µg/L.

Tableau 23 : Valeurs des CSEO et CE_{50} mesurées après 48 h d'exposition aux quatre contaminants étudiés des larves de palourde au stade de la métamorphose. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Epoxiconazole	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CSEO	109 ± 18,77	1,87 ± 0,87	0,62 ± 0,15	0,13 ± 0,10
CE_{50}	252 ± 21,11	4,24 ± 2,12	1,98 ± 0,36	1,90 ± 0,94

4.2. Effet des contaminants sur le déroulement de la métamorphose

Le dénombrement des larves après induction de la métamorphose et incubation 48 h en présence des contaminants a permis de les classer suivant quatre catégories :

- larves métamorphosées (ou post-larves) ;
- larves avec métamorphose incomplète ;
- larves non métamorphosées ;
- larves mortes.

4.2.1. Effet de l'époxiconazole

La figure 55 montre, qu'au sein du lot témoin, après 48 h d'incubation, 45 % des larves sont métamorphosées (post-larves), 2 % n'ont pas achevé leur métamorphose (métamorphose incomplète), 43 % ne sont pas métamorphosées (larves) et 10 % sont mortes.

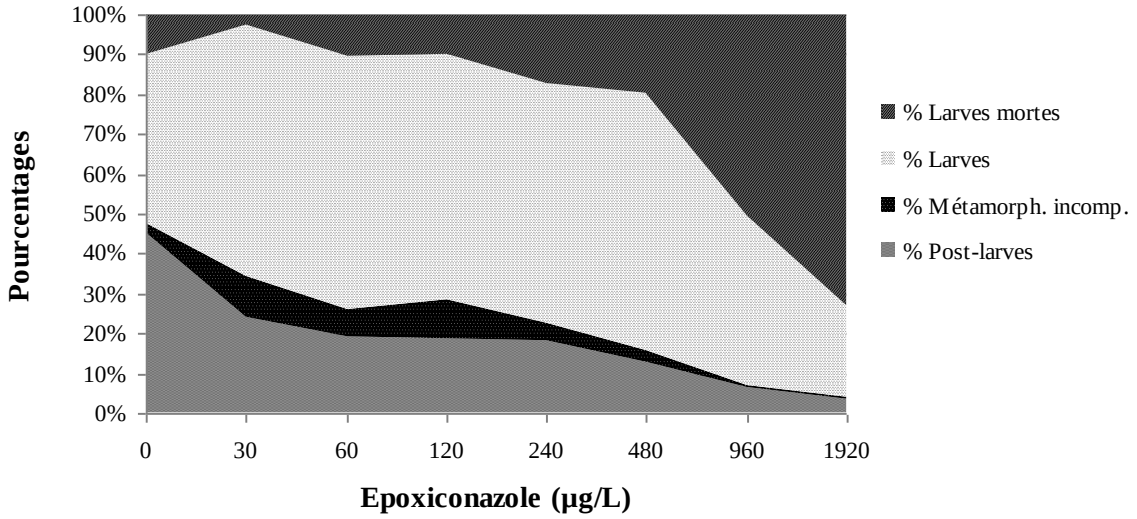


***Figure 55** : Effet de la concentration en époxiconazole sur la métamorphose des larves de palourde, évalué après 48 h d'incubation. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.*

Le traitement par l'époxiconazole affecte significativement le taux de métamorphose des larves. En effet, à la concentration de 30 µg/L, le fongicide diminue le pourcentage de post-larves qui chute à 24 % et augmente très nettement le taux de larves avec métamorphose incomplète (10 %) et de larves non métamorphosées (63 %) ; une réduction du taux de larves mortes, qui chute de 10 à 3 %, est également observée. Aux concentrations de 60 et 120 µg/L en époxiconazole, les pourcentages de post-larves, de larves à métamorphose incomplète et de larves non métamorphosées sont proches de ceux observés à la concentration de 30 µg/L, avec toutefois un taux le mortalité des larves plus élevé (9-10 %), équivalent à celui du témoin. Globalement, à partir de la concentration de 240 µg/L en époxiconazole, les taux de post-larves, de larves à métamorphose incomplète et non métamorphosées diminuent progressivement, cependant que le pourcentage de larves mortes augmente. Ainsi, à la concentration de 1 920 µg/L, seuls 4 % de larves sont métamorphosées, 23 % des larves sont non

métamorphosées et 73 % des larves sont mortes ; aucune larve à métamorphose incomplète n'est observée.

4.2.2. Effet de l'Opus

L'addition à l'eau de mer, de l'Opus à faible concentration (1,47 et 2,95 µg/L) induit un léger accroissement du taux de post-larves (53 % contre 45 % chez le témoin), taux qui diminue ensuite progressivement avec la concentration en fongicide pour n'être plus que de 14 % en présence de 94,26 µg/L (Figure 56). Par ailleurs, le pourcentage de larves non métamorphosées, inchangé à 42 % en présence d'Opus à la concentration de 1,47 µg/L, augmente ensuite progressivement avec l'élévation de la concentration en fongicide, atteignant 70 % après traitement avec 94,26 µg/L d'Opus. Quelle que soit la concentration en Opus utilisée, le taux de larves à métamorphose incomplète reste très faible (2-3 %), non significativement différent du témoin. Quant au taux de mortalité, fortement réduit par l'Opus jusqu'à la concentration de 47,13 µg/L (< 2 %), il augmente ensuite brusquement pour atteindre 17 % en présence de 94,26 µg/L.

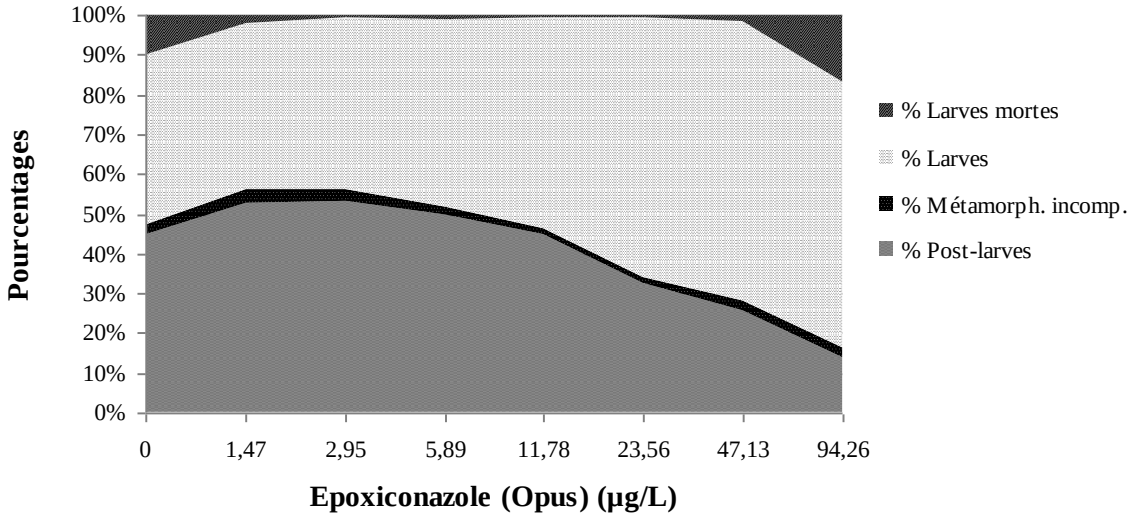


Figure 56 *: Effet de la concentration en époxiconazole de l'Opus sur la métamorphose des larves de palourde, évalué après 48 h d'incubation. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.*

4.2.3. Effet du nonylphénol

La figure 57 montre que, dès la concentration de 0,5 µg/L, le nonylphénol induit une diminution du taux de post-larves, diminution qui s'accentue avec l'élévation de la

concentration en adjuvant ; ainsi ce taux, de 45 % chez le témoin, n'est plus guère que de 6 % en présence de 32 µg/L.

Le traitement par le nonylphénol à des concentrations comprises entre 0,5 et 4 µg/L, produit une augmentation du taux de larves non métamorphosées, taux qui de 43 % chez le témoin atteint une valeur de 70 % ; seule la concentration la plus élevée en nonylphénol (32 µg/L) induit une réduction importante de la proportion de ce type de larves qui chute à 20 %.

L'action du nonylphénol sur le pourcentage de larves à métamorphose incomplète est également fortement dépendante de la concentration. Ainsi, pour les concentrations comprises entre 0,5, et 4 µg/L, une augmentation de ce pourcentage est observée, s'élevant de 2 % (témoin) à des valeurs de 15 à 20 % ; en revanche, à partir de 8 µg/L, le nonylphénol induit une réduction du taux de ce type de larves, qui chute à 0,5 % après exposition à 32 µg/L.

Par ailleurs, le taux de mortalité des larves, de 10 % chez le témoin, s'avère également fonction de la concentration en nonylphénol utilisée. Si, aux concentrations comprises entre 0,5 et 4 µg/L, le nonylphénol affecte peu ou abaisse le taux de larves mortes, en revanche dès 8 µg/L, il induit une augmentation progressive et significative de ce taux qui atteint 75 % en présence de 32 µg/L.

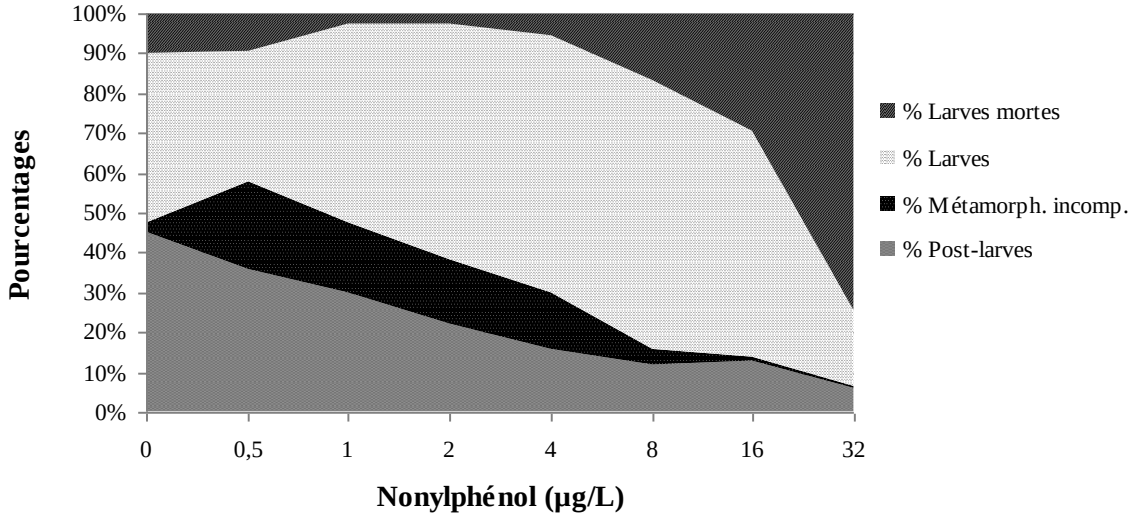


Figure 57 *: Effet de la concentration en nonylphénol sur la métamorphose des larves de palourde. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.*

4.2.4. Effet du cuivre

En présence de concentrations croissantes en cuivre, le pourcentage de post-larves diminue progressivement, évoluant d'un taux de 45 % (témoin) vers une valeur de 1 %, obtenue après addition de cuivre sous forme de sulfate de cuivre à la concentration de 256 µg d'ion cuivre/L (Figure 58).

Le taux de larves à métamorphose incomplète et celui de larves non métamorphosées ne varie pas significativement sous l'action du cuivre. En revanche, une forte augmentation du taux de mortalité est observée dès 4 µg/L (39 %), qui s'accentue avec l'élévation de la concentration en cuivre, pour atteindre un taux de mortalité de 75 % à 256 µg/L.

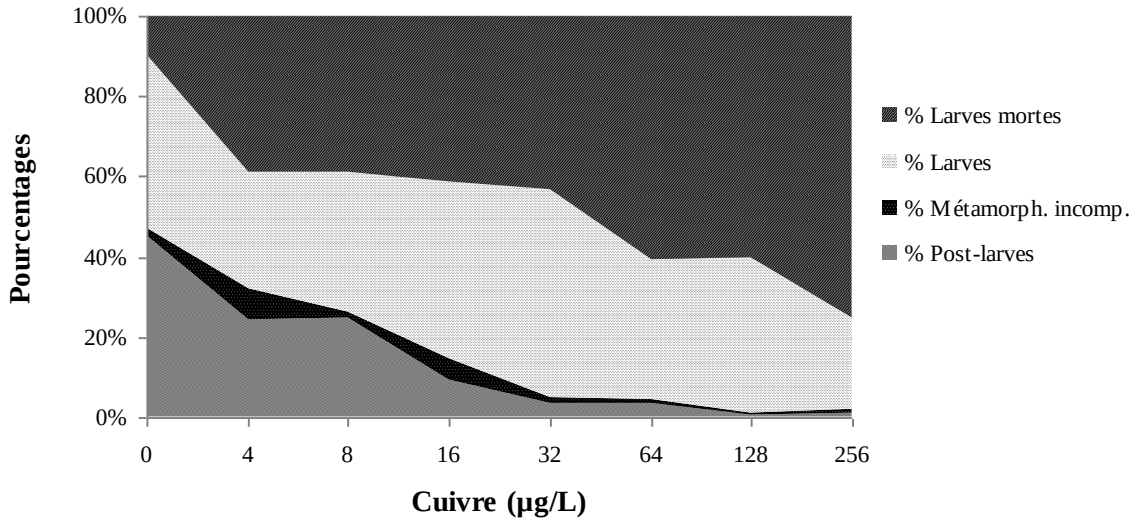


Figure 58 *: Effet de la concentration en cuivre sur la métamorphose des larves de palourde. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.*

5. Effet sur la croissance du naissain de palourde

Une évaluation de l'action des différents contaminants sur la croissance des naissains de palourde a été effectuée après treize jours d'exposition. Les résultats consignés dans le tableau 24 montrent que le contaminant le plus toxique s'avère être le cuivre, avec une CSEO de 5,2 µg/L et une CE_{50} de 12,1 µg/L. Le nonylphénol et l'Opus présentent des toxicités moindres et proches l'une de l'autre, se traduisant par des CSEO de 11,6 et 16,7 µg/L et des CE_{50} de 37,5 et 40,9 µg/L. L'époxiconazole constitue le contaminant le moins toxique des quatre composés étudiés, avec une CSEO de 1 698 µg/L et une CE_{50} de

3 111 µg/L, valeurs 101 et 76 fois supérieures à celles observées pour la formulation commerciale.

Tableau 24 : Valeurs des CSEO et CE_{50} mesurées après 13 j d'exposition du naissain de palourde aux quatre contaminants étudiés. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Epoxiconazole	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CSEO	1698 ± 189,5	16,7 ± 5,33	5,20 ± 1,69	11,6 ± 3,98
CE_{50}	3111 ± 325, 9	40,9 ± 11,66	12,1 ± 1,83	37,5 ± 9,38

6. Etude de la toxicité des contaminants sur les œufs et les larves du turbot (*P. maxima*)

6.1. Effet sur l'éclosion des œufs de turbot

Un traitement de 48 h par le nonylphénol, l'époxiconazole, l'Opus ou le sulfate de cuivre qui est utilisé comme toxique de référence dans cette étude, a été appliqué aux œufs de turbot avant leur éclosion. Le tableau 25 montre une gradation dans les effets inhibiteurs de ces quatre contaminants. Le nonylphénol s'avère le composé le plus toxique, avec une CSEO de 9,1 µg/L et une CE_{50} de 17 µg/L cependant que le fongicide époxiconazole, se révèle 170 et 205 fois moins efficace que l'adjuvant, avec une CSEO de 1 543 µg/L et une CE_{50} de 3 490 µg/L. La formulation commerciale Opus ainsi que l'ion cuivre présentent des toxicités intermédiaires, avec respectivement des valeurs de CSEO de 51,3 et 19,6 µg/L et de CE_{50} de 101 et 34,4 µg/L.

Tableau 25 : Valeurs des CSEO et CE_{50} pour quatre contaminants, concernant l'éclosion des œufs du turbot. Mesures après 48 h d'exposition à l'époxiconazole, l'Opus, le nonylphénol ou au cuivre. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Epoxiconazole	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CSEO	1 543 ± 89	51,3 ± 11,3	19,6 ± 3,7	9,10 ± 1,65
CE_{50}	3 490 ± 127	101 ± 4,2	34,4 ± 1,6	17 ± 0,92

6.2. Effet sur la survie des larves de turbot

Six jours après l'exposition aux différents contaminants, la survie des larves a été évaluée. Comme observé pour l'éclosion des œufs, il apparaît que c'est le nonylphénol

qui se révèle le plus toxique vis-à-vis de la survie des larves, avec une CL_{10} de 1,21 µg/L et une CL_{50} de 2,78 µg/L et, l'époxiconazole le contaminant le moins létal, avec une CL_{10} de 259 µg/L et une CL_{50} de 492 µg/L (Tableau 26). Sous sa formulation commerciale Opus, le fongicide, bien qu'environ 2 fois (de 2,1 à 2,5 fois) moins toxique que le nonylphénol, s'avère surtout 30 fois moins létal que la molécule active époxiconazole, présentant une CL_{10} de 3,01 µg/L et une CL_{50} de 5,9 µg/L. L'ion cuivre vient en troisième position dans le classement des contaminants testés concernant la survie des larves du turbot, avec des valeurs de CL_{10} et de CL_{50} respectivement de 5,7 µg/L et 9,8 µg/L.

Tableau 26 : Valeurs des CL_{10} et CL_{50} pour quatre contaminants, concernant la survie des larves du turbot. Mesures après 6 j d'exposition à l'époxiconazole, l'Opus, le nonylphénol ou au cuivre. Résultats exprimés en µg/L ± ES.

	Epoxiconazole	Opus	Cuivre	Nonylphénol
CL_{10}	259 ± 25,1	3,01 ± 0,88	5,7 ± 0,8	1,21 ± 0,72
CL_{50}	492 ± 22,4	5,9 ± 0,19	9,8 ± 0,69	2,78 ± 0,49

II. Action directe et indirecte *via* l'alimentation des contaminants sur le naissain de palourde

Une étude de l'action directe et indirecte des quatre contaminants sur le naissain de palourde a été effectuée afin d'évaluer leurs effets sur la croissance et déterminer la présence ou non d'un effet indirecte *via* l'alimentation sur le naissain de palourde. Pour ce faire, le naissain élevé en microcosmes maintenus en obscurité totale, a été exposé, directement ou indirectement *via* l'alimentation, aux différents contaminants et la longueur des larves a été mesurée. Ces bio-essais en semi-continu ont été réalisés avec un renouvellement de l'eau de mer et des contaminants aux différentes concentrations toutes les 48 h. Complémentairement, une étude de l'influence des contaminants sur la consommation de la microalgue *T-iso* par le naissain a été réalisée.

1. Action directe

1.2. Effet sur la cinétique de croissance du naissain

La croissance des palourdes témoins montre une allure exponentielle (Figures 59, 60, 61 et 62). Présentant une longueur initiale moyenne initiale de 184,8 µm, les larves témoins croissent en treize jours jusqu'à une longueur moyenne de 379,4 µm.

1.2.1. Effet de l'époxiconazole

Les résultats de la figure 59 montrent que l'inhibition de la croissance du naissain est fortement dépendante de la concentration en époxiconazole ajouté à l'eau de mer. L'inhibition observée est maximale à deux jours d'exposition, variant entre 37 et 93 % selon la concentration en fongicide ajouté. Par la suite, une atténuation progressive se produit au cours du temps. Ainsi, aux concentrations de 37 et 111 µg/L, le fongicide, qui réduit la croissance du naissain de 38 % et 56 % à 2 j, n'entraîne plus que 9 % et 27 % d'inhibition à 4 j et n'affecte plus significativement la croissance à partir du 7ème jour d'exposition.

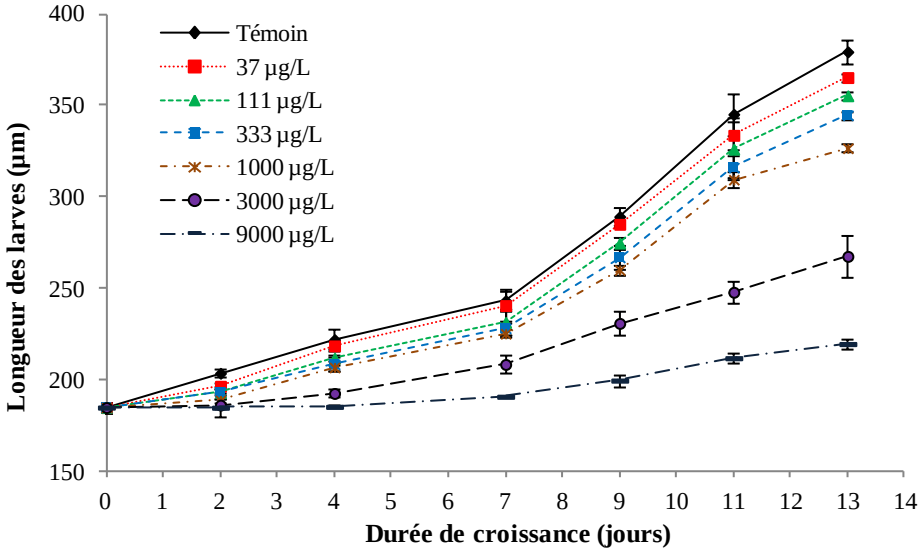


Figure 59 *: Effet au cours du temps de l'époxiconazole, ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES.*

Le même phénomène est observé pour les concentrations plus élevées en époxiconazole : 333, 1 000, 3 000 et 9 000 µg/L ; les inhibitions de la croissance, respectivement de 55, 79, 93 et 100 % au 2ème jour d'élevage, s'atténuent ensuite progressivement pour n'être plus que de 18, 27, 57 et 82 % au 13ème jour d'exposition au fongicide.

1.2.2. Effet de l'Opus

L'addition d'Opus aux microcosmes produit, comme l'époxiconazole (molécule active de l'Opus), le même type de phénomène, à savoir une inhibition de la croissance du naissain, forte en début d'élevage puis s'atténuant au cours du temps et cette inhibition est fonction de la concentration en Opus utilisée (Figure 60). Ainsi, les concentrations en Opus de 1,81 et 545 µg/L, induisent des inhibitions de la croissance qui, à 2 j sont respectivement de 47 et 71 %, s'atténuent ensuite progressivement au cours du temps pour disparaître à 13 j. L'exposition du naissain aux concentrations en Opus de 16,35, 49,07 et 147,38 µg/L produit à 2 j des inhibitions qui sont respectivement de 87, 88, 100 % ; une levée partielle de ces inhibitions se réalise ensuite progressivement et les inhibitions résiduelles à 13 j, s'avèrent fonction de la concentration en Opus : 28, 5 et 78 %.

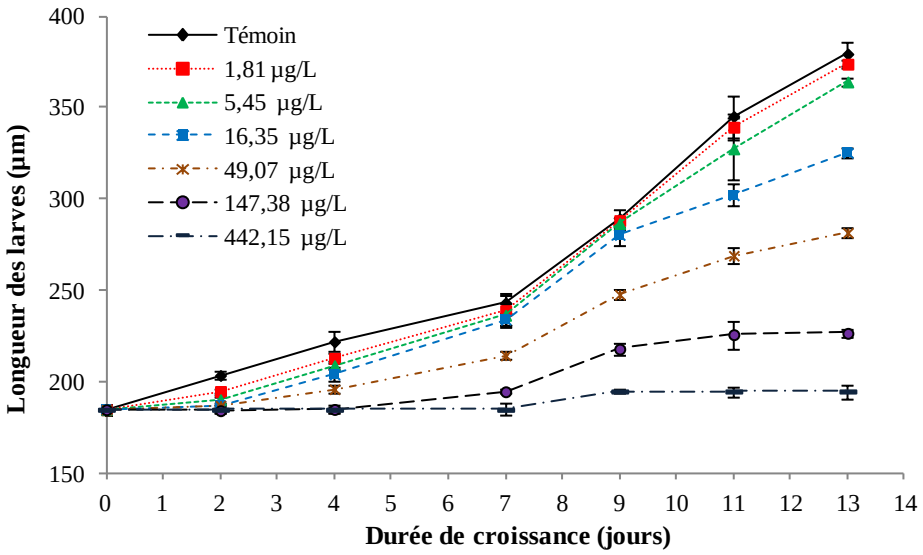


Figure 60 *: Effet au cours du temps de l'époxiconazole (Opus), ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES.*

Seule la concentration la plus élevée du fongicide (442,15 µg/L) se traduit par un blocage quasi total de la croissance tout au long des 13 j d'exposition.

1.2.3. Effet du nonylphénol

Les résultats de la figure 61 montrent l'évolution de la croissance du naissain en présence des différentes concentrations du nonylphénol dans les microcosmes.

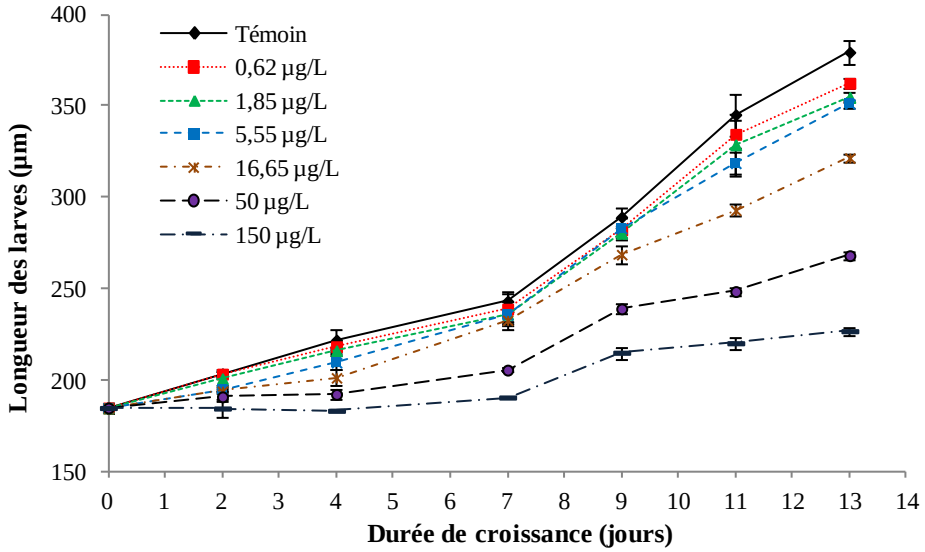


***Figure 61** : Effet au cours du temps du nonylphénol, ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES.*

Pour des concentrations en adjuvant de 0,62 et 1,85 µg/L, aucun effet significatif sur la croissance des naissains n'est observé. En revanche, à la concentration de 5,55 µg/L, le nonylphénol produit une inhibition de la croissance, forte au début de l'élevage (46 % à 2 j) et qui s'atténue ensuite progressivement pour devenir non significative au 13ème j. L'exposition aux concentrations de 16,65, 50 et 150 µg/L en nonylphénol induit également des inhibitions respectivement de 51, 67 et 100 % à 2 j d'élevage. Ces inhibitions s'atténuent ensuite mais restent significatives jusqu'au dernier jour de l'expérience, étant de 30, 57 et 78 %.

1.2.4. Effet du cuivre

La figure 62 montre que, quelle que soit la concentration en cuivre testée, une forte inhibition de la croissance des larves est observée dès le deuxième jour d'élevage. Cette inhibition se maintient ainsi jusqu'au 7ème jour, se traduisant par des larves dont la taille n'est que 84-96 % de celle des témoins. A partir du 7ème jour, en présence de cuivre à la concentration de 16 µg/L, une levée partielle et progressive de l'inhibition est constatée permettant aux larves d'atteindre à 13 j une taille réduite de 44 % par rapport aux témoins. Pour des concentrations en cuivre supérieures (48, 144, 432 et 1296 µg/L), une faible croissance des larves est observée puisque les larves ne possèdent à 13 j qu'une taille comprise entre 7 et 18 % de celle des témoins. La concentration la plus élevée en cuivre (3 888 µg/L) produit un blocage total de la croissance du naissain.

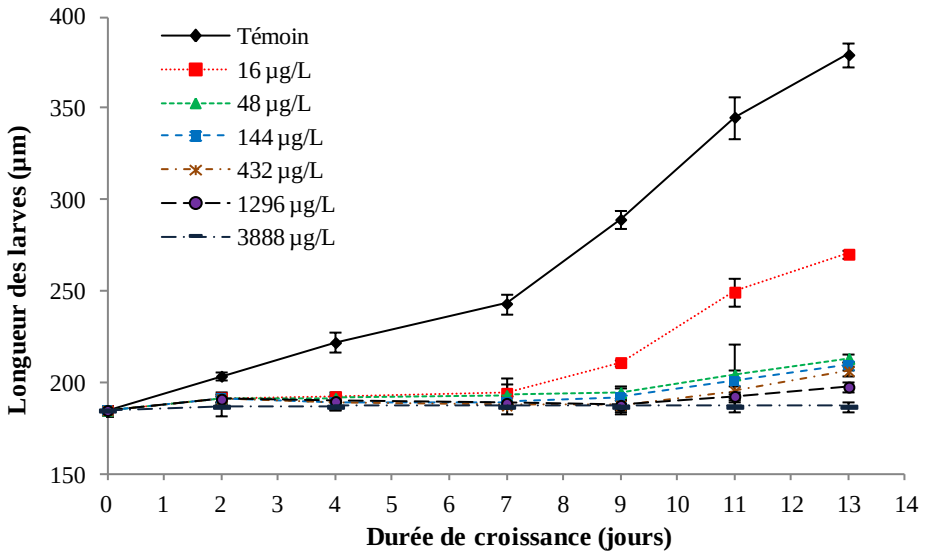


***Figure 62** : Effet au cours du temps du cuivre (µg/L), ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES.*

1.3. Effet des contaminants sur la consommation d'algues par le naissain de palourde

Pour apprécier l'influence des contaminants sur l'alimentation du naissain, un dénombrement des cellules d' *I. aff. galbana* non consommées a été effectué après 48 h de traitement.

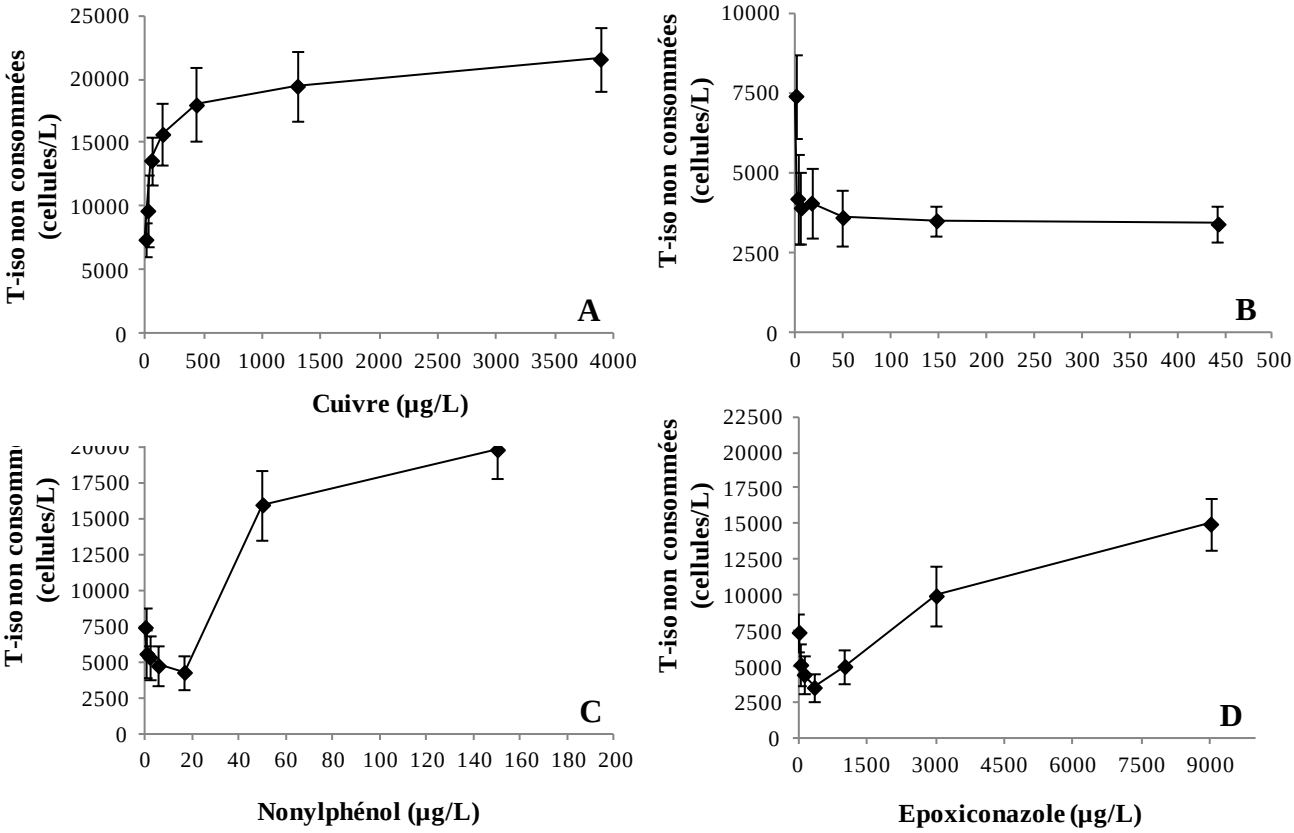


Figure 63 *: Influence des quatre contaminants, ajoutés à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur les densités de l'algue I. aff. galbana non consommée par le naissain de palourde après 48 h de traitement. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES.*

Les résultats obtenus à l'issue des 48 h des différents traitements sont exprimés d'une part, en densités de cellules non consommées (Figure 63) et d'autre part, en pourcentage de cellules consommées par rapport à la valeur fournie initialement de 40 000 cellules/L (Figure 64).

Dans le microcosme témoin, la densité des cellules de *T-iso* restantes dans le milieu d'élevage après 48 h se chiffre à 7 406 cellules/L (Figure 63) qui correspondent à une consommation de 81,5 % de la quantité initialement fournie (Figure 64).

La figure 63A montre que l'addition de sulfate de cuivre aux microcosmes se traduit, après 48 h, par une augmentation de la densité de cellules de *T-iso* non consommées et, cette action est dépendante de la concentration en métal. En effet, pour la plus faible concentration en cuivre utilisée (16 µg/L), une densité de 9 674 cellules/L est retrouvée

(figure 63A), correspondant à une consommation de 74 % de la ration initiale (figure 64A) alors que pour la concentration la plus élevée (3 888 µg/L), le nombre de cellules non consommées s'élève à 21 588 cellules/L, signifiant une consommation de 54 % de la ration initiale (figure 63A).

L'influence de la concentration en Opus sur la densité cellulaire de *T-iso* retrouvée après 48 h d'exposition est rapportée dans la figure 63B. Dès la concentration en Opus de 1,81 µg/L, une diminution significative de la densité des cellules de *T-iso* retrouvées dans l'eau de mer est observée, s'abaissant à 4 195 cellules/L par rapport à 7 406 chez le témoin et cette diminution tend à s'accentuer avec l'élévation de la concentration en fongicide. Il apparaît ainsi que dès la concentration en Opus de 1,81 µg/L, 89,5 % des algues ont été consommées et ce pourcentage augmente légèrement pour atteindre 91,5 % avec la plus forte concentration en Opus (442,48 µg/L) (Figure 64B).

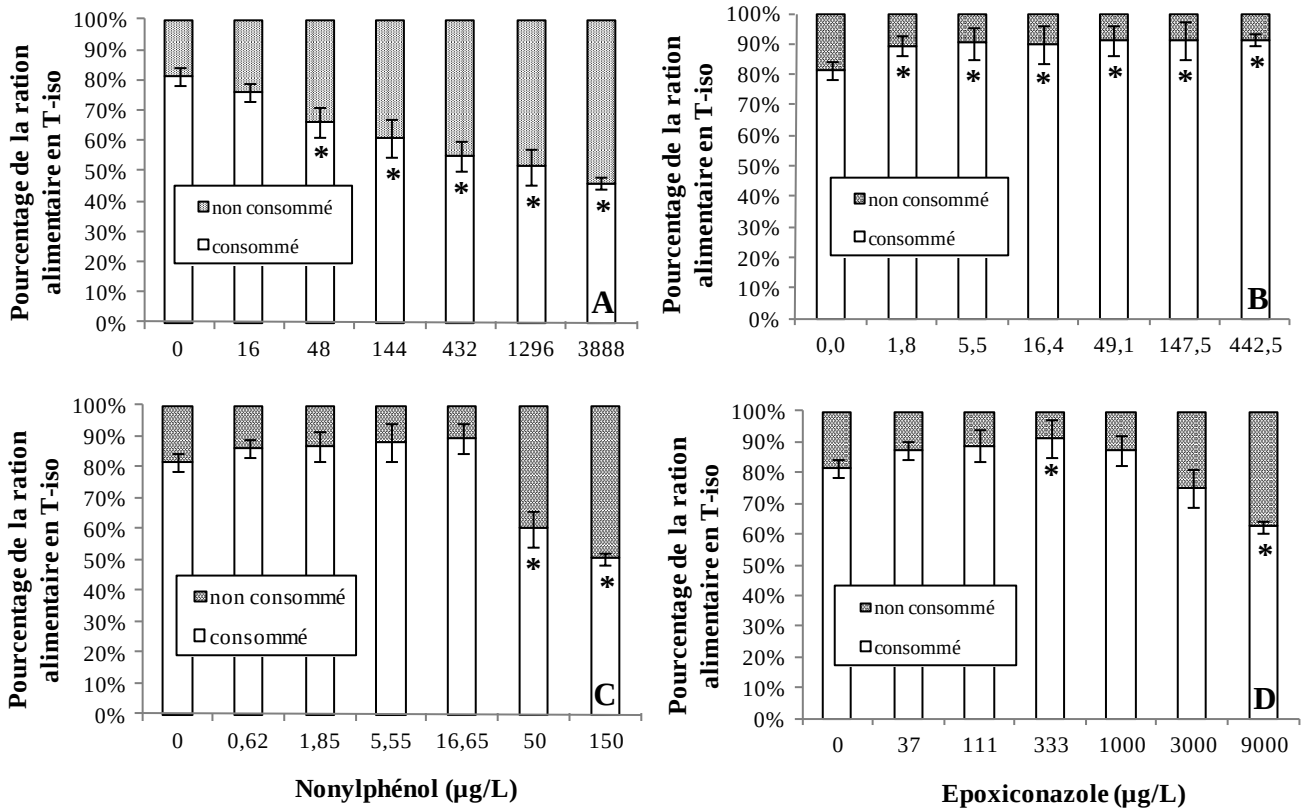


***Figure 64** : Effet du cuivre **(A)**, de l'Opus **(B)**, du nonylphénol **(C)** et de l'époxiconazole **(D)**, ajoutés à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur le pourcentage d'algues T-iso consommées par le naissain de palourde après 48 h d'exposition. Résultats exprimés en % par rapport au témoin ± ES. Densité d'algues initiale : 40 000 cellules/L. * désigne une différence significative au seuil de 5 % des densités cellulaires de T-iso par rapport aux témoins.*

L'addition de nonylphénol dans les microcosmes, aux concentrations de 0,62, 1,85, 5,55 et 16,55 µg/L, se traduit par une réduction légère du nombre de cellules de *T-iso* non consommées (Figure 63C). En revanche, pour des concentrations plus élevées en adjuvant (50 et 150 µg/L), le nombre de cellules non consommées augmente fortement puisqu'une densité de cellules de 19 812 cellules/L est retrouvée en présence de 150 µg/L, c'est à dire 2,67 fois plus que chez le témoin. L'expression des résultats en pourcentage d'algues consommées montrée dans la figure 64C fait apparaître d'une part, une légère augmentation de ce pourcentage aux faibles concentrations en adjuvant et, d'autre part, met en évidence une réduction importante de la consommation des algues en présence de 50 et 150 µg/L de nonylphénol ; le taux de consommation chutant à 40 et 50 %.

De façon analogue, l'ajout d'époxiconazole dans l'eau de mer des microcosmes, produit aux faibles concentrations (37, 111, 333 et 1 000 µg/L), une diminution progressive de la densité cellulaire de *T-iso* non consommée par les palourdes (Figure 63D). Si l'effet reste encore inhibiteur bien qu'atténué en présence de 333 µg/L d'époxiconazole, une forte stimulation est en revanche observée pour les concentrations de 3 000 et 9 000 µg/L, avec des densités cellulaires restantes qui s'élèvent respectivement à 9 967 cellules/L et 14 999 cellules/L ; ces valeurs de densités traduisent donc une baisse significative de la consommation alimentaire puisque seulement 75 % et 62,5 % des algues sont consommées en présence 3 000 µg/L et 9 000 µg/L d'époxiconazole par rapport à 81,5 % chez le témoin (Figure 64D).

2. Action indirecte des contaminants *via* la contamination de l'algue fourragère *T-iso* sur le naissain de palourdes

2.1. Effet sur la croissance du naissain

L'effet des contaminants sur le naissain de palourde a été étudié en action indirecte, *via* le biais d'une algue fourragère contaminée (*T-iso*). A cet effet, des cultures de la microalgue ont été contaminées au cours de leur phase stationnaire de croissance, pendant 24 h par les molécules chimiques étudiées. Cinq types de contaminations ont été réalisés avec du nonylphénol 1,5 µg/L et 15 µg/L ; de l'Opus 5,16 µg/L et 51,6 µg/L ainsi qu'avec un mélange correspondant aux concentrations les plus faibles à savoir

1,5 µg de nonylphénol/L + 5,16 µg d'Opus/L. En effet, dans le milieu naturel les organismes ne sont généralement pas exposés à une seule molécule à la fois, mais à des mélanges de substances de plusieurs types, ce qui peut générer des effets additifs, antagonistes ou synergiques. Ces mélanges sont susceptibles d'abaisser les seuils de toxicité des molécules testées ce qui rend primordiale l'évaluation des effets provoqués par les mélanges.

Après centrifugation, et plusieurs lavages à l'eau de mer, les algues contaminées ont servi à l'alimentation fournies des naissains des microcosmes (500 larves par litre), à raison de 40 000 cellules algales/L. Un renouvellement de la ration alimentaire est opéré tous les deux jours et les microcosmes sont maintenus à 18 °C, à l'obscurité, pendant 12 j.

L'action des différents contaminants testés est illustrée dans la figure 65. Dans les microcosmes témoins, la longueur des larves, de 270 µm au début de l'expérience, atteint après 12 j d'élevage, une longueur de 374 µm.

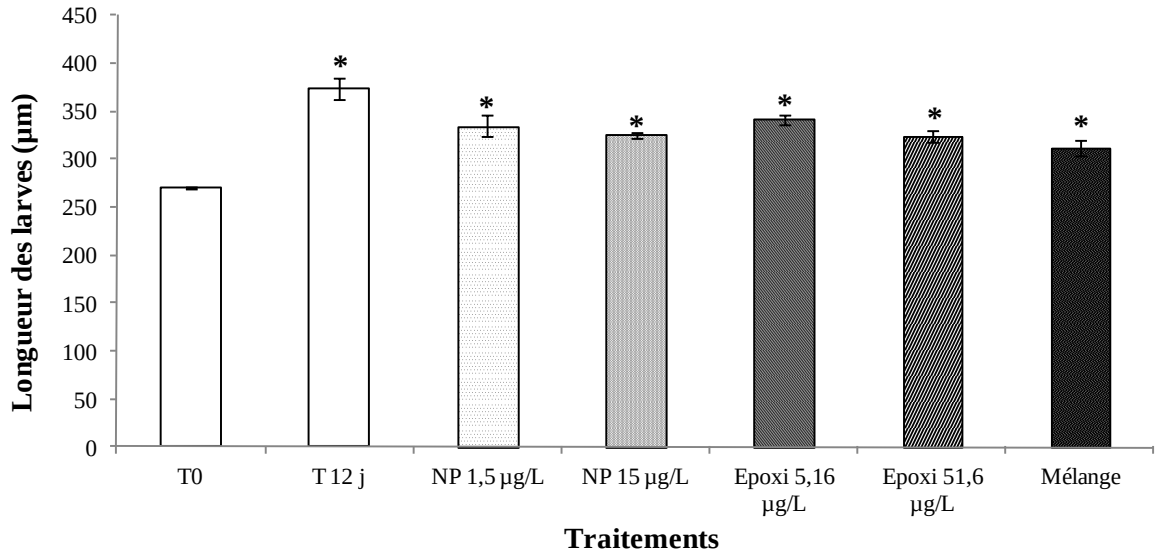


***Figure 65** : Effet des contaminants, testés en action indirecte via la contamination de T-iso, sur la croissance des larves de palourde, mesurée après 12 j d'exposition. Résultats exprimés en µm ± ES. Nonylphénol : 1,5 (NP 1,5) et 15 µg/L (NP 15) ; Opus : 5,16 (OP 5,16) et 51,6 µg/L(OP 51,6) ; Mélange : Opus (5,16 µg/L) + Nonylphénol (1,5 µg/L). * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à T_0.*

L'alimentation des larves par des microalgues, contaminées par le nonylphénol aux concentrations de 1,5 ou 15 µg/L, induit des inhibitions significatives de la croissance des larves, de respectivement 10 et 13 %.

Lorsque *T-iso* a été contaminée par 5,16 et 51,6 µg/L d'Opus, la croissance du naissain de palourde se trouve significativement réduite de 9 et 13 %.
Quand un mélange constitué d'Opus (5,16 µg/L) et de nonylphénol (1,5 µg/L) a servi à la contamination des algues, leur utilisation pour nourrir les larves entraîne une inhibition significative de la croissance des naissains de palourde de 17 %.

2.2. Effet de la contamination des algues fourrage sur leur consommation par le naissain

Complémentairement à la mesure de croissance, un suivi de la consommation des algues par les larves a été effectué sur une période de 12 j.
La figure 66 montre que chez les larves témoins, les densités de l'algue *I. aff. galbana* non consommées par le naissain, diminue avec le temps. Ainsi après ajout de 40 000 cellules de *T-iso*/L dans les milieux de culture, il reste 16 384 cellules/L après 2 j d'élevage et seulement 5 886 cellules/L au 12ème jour d'élevage.

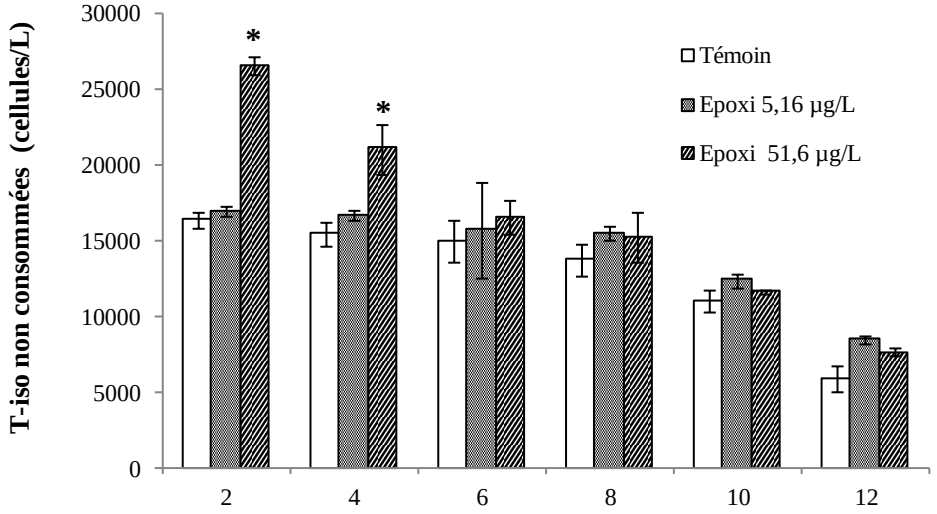


***Figure 66** : Effet de l'époxiconazole (Opus) : 5,16 et 51,6 µg/L, testé en action indirecte, via une alimentation par l'algue T-iso contaminée, sur la densité d'algues non consommées par le naissain de palourde au cours du temps. Densité de T-iso initiale : 40 000 cellules/L. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à témoin.*

L'alimentation des larves par des algues contaminées par l'Opus à la concentration de 5,16 µg/L, ne produit pas d'effets significatifs sur la consommation de micro-algues par le naissain pendant les 12 j de l'expérience (Figure 66). En revanche, l'utilisation d'une culture d'algues préalablement contaminées par l'Opus à la concentration de 51,6 µg/L, se répercute sur la consommation de *T-iso*. En effet, dès le 2ème j d'élevage, la densité des cellules non consommées qui, chez le témoin est de 16 384 cellules/L, s'avère être de 26 566 cellules/L. A 4 j, cette différence s'atténue mais reste significative, avec une densité de *T-iso* non consommée égale à 21 061 cellules/L (15 473 chez le témoin) et qui devient ensuite non significative à partir du 6ème j de l'expérience (14 971 chez le témoin).

Lorsque les cellules de *T-iso* contaminées par le nonylphénol sont utilisées, l'adjuvant à la concentration de 1,5 µg/L ne produit pas d'effet significatif sur la consommation de *T-iso* par le naissain (Figure 67). En revanche, la contamination de *T-iso* par 15 µg/L de nonylphénol diminue la consommation d'algues par le naissain. Ainsi à 2 j d'élevage, une densité d'algues non consommées de 25 387 cellules /L est observée qui, chez le témoin n'était que de 16 384 cellules/L. Cette différence s'atténue ensuite progressivement pour disparaître totalement en fin d'élevage.

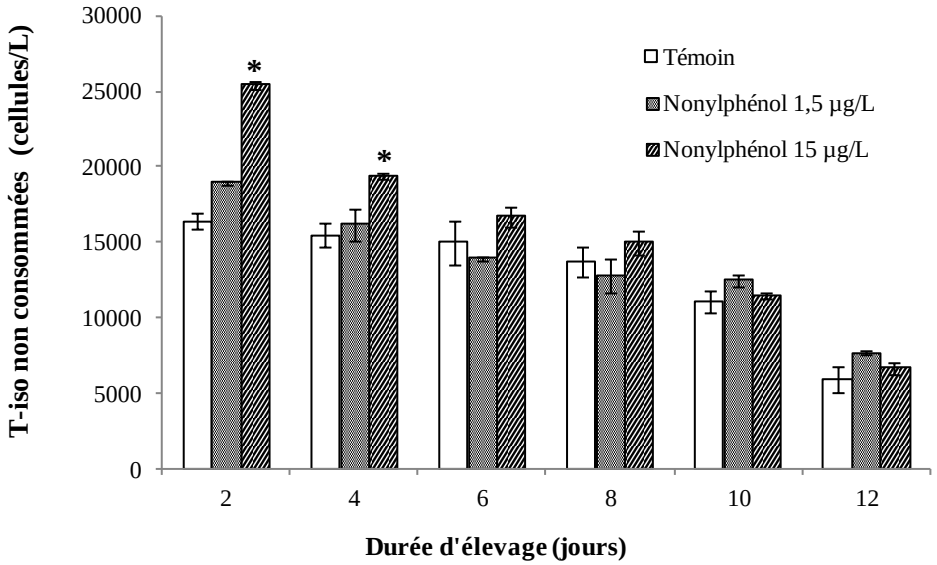


***Figure 67** : Effet du nonylphénol (1,5 et 15 µg/L), testé en action indirecte, via une alimentation par l'algue T-iso contaminée, sur la densité d'algues non consommées par le naissain de palourde au cours du temps. Densité de T-iso initiale : 40 000 cellules/L. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

L'alimentation des larves par des algues contaminées par le mélange Opus (5,16 µg/L) + nonylphénol (1,5 µg/L), augmente significativement le nombre de cellules de *T-iso* non consommées à 2 j de l'expérience puisqu'une densité de 24 929 cellules/L de cellules non consommées est observée (16 384 cellules/L chez le témoin) (Figure 68). Cet effet disparaît ensuite aucours de la durée du bio-essai et, aucun effet significatif de l'alimentation contaminée sur la consommation de *T-iso* par les larves, n'est constaté.

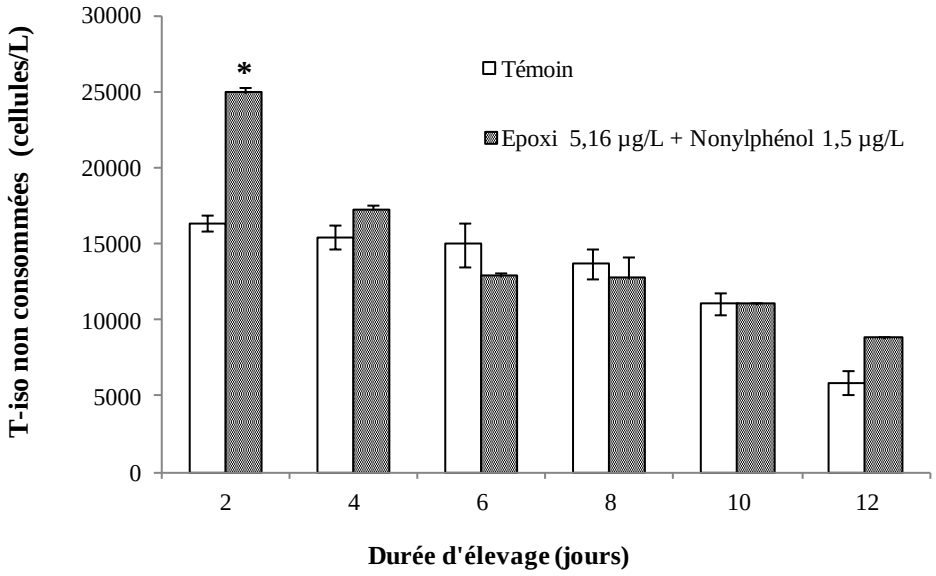


Figure 68 *: Effet du mélange : Opus (5,16 µg/L) + Nonylphénol (1,5 µg/L), testé en action indirecte, via une alimentation par l'algue T-iso contaminée, sur la densité d'algues non consommées par le naissain de palourde au cours du temps. Densité de T-iso initiale : 40 000 cellules/L. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.*

III. Discussion

L'action de quatre contaminants : le fongicide époxiconazole, l'Opus (formulation commerciale de l'époxiconazole), l'adjuvant nonylphénol et le cuivre a été étudiée sur différents stades de développement de quatre modèles animaux marins appartenant à trois niveaux trophiques distincts, à savoir un vertébré le turbot *S. maximus*, un échinoderme l'oursin *P. lividus* et deux mollusques : l'huître creuse *C. gigas* et la palourde japonaise *R. philippinarum*.

Les résultats montrent que, pour la majorité des bio-essais, ce sont le cuivre et le nonylphénol qui s'avèrent les plus toxiques, présentant les CE_{50} les plus faibles, variant de 1,9 - 2 µg/L (métamorphose des larves de palourde) à 34,4 - 37,5 µg/L (éclosion des œufs de turbot pour le cuivre et croissance du naissain de palourde pour le nonylphénol). Ainsi, qu'il s'agisse du développement embryo-larvaire (oursin, palourde ou huître) ou de la métamorphose des larves de palourde, le nonylphénol et le cuivre présentent des CE_{50} équivalentes et inférieures à celles observées en présence d'Opus. En revanche, concernant la croissance du naissain de palourde, très sensible à l'action du cuivre (CE_{50} de 12,1 µg/L), l'Opus s'avère aussi toxique que le nonylphénol (CE_{50} de 40,9 et 37,5 µg/L). L'adjuvant nonylphénol constitue le contaminant le plus toxique vis-à-vis des œufs de turbot (éclosion et survie) et leur éclosion est plus sensible à l'action du cuivre qu'à celle de l'Opus cependant que pour leur survie, la situation est inversée.

L'époxiconazole, molécule active de la formulation commerciale Opus, s'avère le composé le moins inhibiteur des quatre contaminants, générant des valeurs de CE_{50} de 252 à 3 490 µg/l, c'est-à-dire 34 à 169 fois supérieures à celles produites par l'Opus, ce qui confirme le rôle joué par les adjuvants dans la toxicité des pesticides.

La toxicité du nonylphénol vis-à-vis des organismes aquatiques a été soulignée dans la revue de Servos (1999) et dans l'étude comparative de Lussier *et al*. (2000) ; ces auteurs rapportent des valeurs de CL_{50} variant de 17 à 3 000 µg/L pour les poissons et les invertébrés. Plus récemment, des valeurs du même ordre de grandeur ont été obtenues par Matozzo *et al.* (2003), Quinn *et al.* (2006), TenEyck and Markee (2007) et Ricciardi *et al.* (2008), pour la palourde (*Tapes philippinarum*), la moule zèbre (*Dreissena*

polymorpha), la daphnie (*Ceriodaphnia dubia*) et le crabe *(Carcinus aestuarii*), avec respectivement des CL_{50} de 1,12, 3,68, 0,092 et 6,49 mg de nonylphénol/L. Composé lipophile, le nonylphénol peut être absorbé et bioaccumulé par les organismes aquatiques. Cependant, la sensibilité d'un organisme au nonylphénol ne semble pas associée à la capacité de bio-concentration de ce composé dans les tissus ; ainsi, la moule (*Mytilus edulis*) et l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), avec des CL_{50} (96 h) respectivement de 3 et 0,4 mg/L, présentent des facteurs de bio-concentration de 2 700 et 1 370 cependant que le crabe *(Carcinus aestuarii*) accumule 25 fois moins de nonylphénol que la moule mais présente une CL_{50} (96 h) de 6,49 mg/L (Granmo *et al.,* 1989 ; 1991 ; Ekelund *et al*., 1990 ; Ricciardi *et al.* 2008). Bien que de nombreux travaux soulignent une altération par le nonylphénol de la croissance et du métabolisme de la moule *M. edulis*, *Dreissena polymorpha* et *Mytilus galloprovincialis* (Granmo *et al*., 1989 ; Canesi *et al*., 2004 ; Quinn *et al*., 2006 ; Ricciardi *et al.*, 2008 ; Riva *et al*., 2010), de l'huître *C. gigas* (Nice *et al*., 2000), de l'oursin *Arbacia lixula* (Cakal Arslan and Parlak, 2007) et de la palourde *R. decussatus* (Chora *et al*., 2010), peu de travaux font état de la CE_{50} de cet adjuvant bien quelle constitue, selon Spehar *et al*. (2010), un meilleur critère que la CL_{50} pour évaluer la toxicité des contaminants. Toutefois, dans des travaux récents, Zhang *et al*. (2003) et Spehar *et al*. (2010) rapportent, pour quelques organismes d'eau douce, des valeurs de CE_{50} (96 h) comprises entre 21 et 738 µg/L cependant que Liu *et al*. (2011) observent pour l'ormeau (*Haliotis diversicolor supertexta*) une CE_{50} (96 h) de 11,65 µg/L. Les valeurs obtenues dans les différents bio-essais utilisés au cours de cette étude, variant de 1,9 à 20,9 µg/L, s'avèrent donc inférieures ou équivalentes à celles obtenues par ces auteurs.

Le nonylphénol, produit de dégradation des alkylphénols éthoxylates (APEs), entre dans l'environnement majoritairement comme déchet industriel et domestique et sa concentration peut varier grandement, en fonction des facteurs anthropogéniques. La présence d'alkylphénols et de ses métabolites dans les océans provient des rivières polluées et de la décharge directe des eaux usées. Des concentrations de 0,13 à 5,1 µg/L de (APEs) ont été trouvées dans l'eau des rivières (Maguire, 1999 ; Rice *et al*., 2003 ; Michelmore and Rice, 2006) mais des valeurs supérieures à 100 µg/L ont également été rapportées (Blackburn and Waldock, 1995 ; Bennie, 1999). Il en résulte que, dans les régions estuariennes, le nonylphénol peut constituer une menace sérieuse pour les

animaux utilisés dans cette étude, compte tenu des valeurs de CE_{50} trouvées. Ce danger est particulièrement vrai pour la palourde chez qui le nonylphénol présente des CE_{50} de 4,04 et 1,90 µg/L respectivement pour le développement embryo-larvaire et la métamorphose des larves et cette dernière constitue donc le test de toxicité le plus sensible. Ceci s'accorde avec les données de Liu *et al*. (2011) qui constatent une plus grande toxicité du nonylphénol sur la métamorphose des larves d'ormeau (CE_{50} : 1,02 µg/L) que sur le développement du trochophore (CE_{50} : 30,72 µg/L).

En outre, le développement embryo-larvaire de la palourde montre, sous l'effet du nonylphénol, un pourcentage d'anomalies du développement, allant jusqu'au blocage au stade embryon et qui va croissant avec la concentration du contaminant.

Le même phénomène est observé pour le développement embryo-larvaire de l'espèce bio-indicatrice *C. gigas*, souvent utilisé pour évaluer la qualité biologique des eaux et des sédiments des zones côtières soumises aux rejets anthropogéniques (Woelke, 1972 ; Martin *et al*., 1981 ; Chapman et Morgan, 1983 ; Thain, 1983 & 1992 ; Robert et His, 1985 ; Beiras et His, 1994 & 1995 ; His *et al*., 1997). En effet, ce bio-essai, bien que moins sensible que ceux utilisant la palourde (CE_{50} : 20,9 µg/L), se traduit par un pourcentage d'anomalies du développement du manteau et de la coquille qui augmente avec l'élévation de la concentration en nonylphénol du milieu. Ceci s'accorde avec les travaux antérieurs de Nice *et al.* (2000), qui rapportent un retard du développement de la larve D, accompagné d'une baisse du taux de survie et de l'apparition d'anomalies du développement embryo-larvaire sous l'effet du nonylphénol, pouvant être déterminés par l'action de perturbateur endocrinien de ce contaminant.

Des différents bio-essais utilisés, c'est la croissance du naissain de palourde qui se révèle le moins sensible à l'action du nonylphénol (CE_{50} : 37,5 µg/L). Ceci suggère que le stade de développement constitue un élément important pour prédire les effets de l'exposition au nonylphénol, les stades de vie les plus précoces montrant une plus grande sensibilité au contaminant. Des résultats similaires ont été rapportés pour différents toxiques. C'est ainsi que chez la crépidule (*Crepidula fornicata),* l'huître (*C. gigas*) et la moule (*M. galloprovincialis*), la CL_{50} pour le mercure (Hg) augmente avec le stade de développement (Thain, 1984 ; Beiras et His, 1994 & 1995) et, que les larves de mye (*Mya*

arenaria) au stade véligère, s'avèrent plus sensibles aux herbicides (hexazinone, 2,4-D) qu'au stade pédivéligère (Lindsay *et al*., 2010). De façon plus générale, les étapes de croissance et de différentiation des organismes aquatiques s'avèrent être sensibles à la toxicité des contaminants. Ainsi, le nonylphénol inhibe la survie des embryons et la métamorphose du crapaud *Bombima orientalis* (Park *et al*., 2010) de la même façon que le TBT réduit la croissance et la métamorphose des larves de la palourde *Mercenaria mercenaria* (Laughlin *et al*., 1988) et que les hydrocarbures inhibent la croissance et la métamorphose du cnidaire *Heteroxenia fuscescens* et de l'huître *C*. *gigas*, de la moule et de l'oursin (Kushmaro *et al.,* 1997 ; His *et al*., 1997 ; Bellas *et al*., 2008).

Bien que globalement moins efficace que le nonylphénol, l'époxiconazole sous sa formulation commerciale Opus, s'avère toutefois inhibiteur des différents bio-essais utilisés, avec des CE_{50} variant de 4,24 µg/L (métamorphose de la palourde) à 100,9 µg/L (éclosion des œufs de turbot). Ce sont également ces mêmes bio-essais qui se révèlent le plus sensible (métamorphose de la palourde) et le moins sensible (éclosion des œufs de turbot) à l'action de la molécule active seule, avec des CE_{50} respectivement de 252,15 et 3 490 µg/L. La survie des larves de turbot, constitue un bio-essai également sensible à l'application de l'époxiconazole ou de l'Opus, avec toutefois des CE_{50} légèrement plus élevées que dans le cas de la métamorphose des larves de palourde (492,8 et 5,9 µg/L). Peu de travaux ont été consacrés à l'action de ce fongicide sur les organismes marins. Cependant, dans un travail récent, Stachowski *et al*. (2008) rapportent une inhibition de la croissance du naissain d'huître par l'époxiconazole (Opus). Ce résultat, obtenu pour une concentration en époxiconazole de 70 µg/L, est en accord avec l'action de ce fongicide sur la croissance du naissain de la palourde, avec une CE_{50} de 40,9 µg/L. En outre, l'époxiconazole peut augmenter la toxicité d'autres pesticides. Ainsi, il agit en synergie avec un herbicide (bentazone) pour inhiber la croissance du naissain d'huître (Stachowski *et al*. 2008) et, avec un insecticide pyréthroïde (alpha-cyperméthrine), pour induire la mortalité de la daphnie *D*. *magna* (Nørgaard et Cedergreen, 2010). Une perturbation de l'expression des gènes sous l'effet de l'époxiconazole a été rapportée. Ainsi, dans une étude réalisée *in vitro*, Monod *et al*. (2004) montrent que l'époxiconazole induit la maturation des ovocytes de la truite arc-en-ciel et suggèrent que cette action, analogue à celle des gonadotropines, est dépendante de l'expression des gènes (Monod *et al*., 2004). Par ailleurs, le propiconazole, triazole fongique comme l'époxiconazole, en

même temps qu'il inhibe la croisssance de *D. magna*, produit des changements majeurs de transcription des gènes qui indiquent une perturbation de la maturation des oocytes (Soetaert *et al*., 2006).

Le cuivre s'avère toxique vis-à-vis des différents bio-essais utilisés, générant des CE_{50} comprises, pour le développement embryo-larvaire, entre 3,79 et 34,4 µg d'ion cuivre/L. Ces résultats s'accordent avec des travaux antérieurs rapportant des CE_{50} de 66,8 et 46 µg/L pour l'oursin (Fernandez et Beiras, 2001; Manzo *et al.* 2008) et de 9,1 µg/L pour l'embryogenèse de la palourde (Beiras et Albentosa, 2004) et les valeurs retenues dans la norme AFNOR (2009) de 6 à 16 µg/L. La variabilité des valeurs serait fonction de la qualité des géniteurs et de l'eau de mer utilisée (Bougis et Corre, 1974 ; Pétinay *et al*., 2009). Des valeurs de CE_{50} du même ordre de grandeur ont également été obtenues pour l'embryogenèse de la moule *M. galloprovincialis* (10 µg/L) et de l'ascidie *Ciona intestinalis* (48 µg/L) (Bellas *et al*., 2008 ; Beiras et Albentosa, 2004). De nombreuses études ont souligné la toxicité du cuivre vis-à-vis des crustacés tels que *Penaeus monodon* (Guo and Liao, 1992 ; Chen *et al*., 2001), *Palaemon serratus, Maja squinado* et *Homarus gammarus* (Mariño-Balsa *et al*., 2000), *Moina monogolica* (Wang *et al*., 2007) et la tolérance au cuivre augmente chez *Penaus japonicus* avec le stade de développement (Bambang *et al*., 1995). La sensibilité des différents bio-essais au cuivre démontre la possibilité d'envisager leur utilisation comme biomarqueurs de l'environnement marin, ainsi que souligné par de nombreux auteurs (Bougis *et al*., 1979 ; Pagano *et al*.,1991 ; His *et al*., 1999 ; Geffard *et al*., 2001 ; Quiniou *et al*., 2007).

La réduction de croisssance du naissain de palourde, engendrée par l'exposition aux différents contaminants, est accompagnée d'une perturbation de la consommation de l'algue *T-iso*. Si, à faibles concentrations, le nonylphénol et l'époxiconazole stimulent la consommation de l'algue, traduisant vraisemblablement un phénomène d'hormèse ; à fortes concentrations, une réduction est observée dont l'importance va croissant avec la concentration en toxique. Une diminution de la consommation de l'algue est également induite par le cuivre qui va croissant avec l'élévation de la concentration en métal.

L'Opus stimule légèrement la consommation de *T-iso* par le naisssain quelle que soit la concentration ajoutée au milieu.

Lorsque la contamination du naissain est effectuée indirectement par le biais de l'algue préalablement contaminée par l'Opus et/ou le nonylphénol, une réduction de croissance de la palourde est observée à l'issue des 12 jours ; cet effet est associé à une diminution de la consommation de *T-iso* au cours des premiers jours d'alimentation par l'algue contaminée. L'influence d'une telle contamination par l'alimentation sur la croissance a été montrée par Correa-Reyes *et al.* (2007) ; en effet, le nonylphénol bio-accumulé par l'algue *T-iso*, premier niveau de la chaîne trophique, produit, une augmentation de la croissance du crustacé *Artemia salina* et une perturbation hormonale et enzymatique du poisson *Brachydanio rerio*. Cette incidence de l'alimentation sur la croissance a également été rapportée par Wikfors *et al*. (1994) qui constatent une forte réduction de croissance et une mortalité élevée de l'huître *Crassostrea virginica* et de la palourde *Mercenaria mercenaria*, alimentées par des micro-algues contaminées au cadmium. Ces études démontrent donc les effets néfastes des microalgues contaminées sur la survie des espèces prédatrices comme les bivalves ce qui est d'une importance fondamentale pour la structure de la population.

Il apparaît donc qu'une réduction de la population naturelle de filtreurs par les contaminants pourrait être induite par une action i) directe sur le développement embryo-larvaire, la métamorphose et la croissance et ii) indirecte sur la qualité et la bio-disponibilité de l'aliment. Ces effets observés *in vitro*, pour de faibles concentrations en contaminants, pourraient contribuer aux mortalités ou au manque de recrutement observés en milieu naturel.

En conclusion, on peut donc dire que si les analyses chimiques permettent la détermination du degré et de la nature de la pollution, elles ne fournissent pas de preuve de leurs conséquences biologiques. En revanche, les bio-essais permettent la détection de ces effets par une mesure des réponses biologiques des organismes marins, particulièrement en raison de leur grande sensibilité au cours des premiers stades de leur vie (His *et al*., 1999).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était, d'une part, d'étudier l'impact de contaminants chimiques, susceptibles d'être présents dans l'eau de mer, provenant des rivières polluées et des décharges directes d'eaux usées, sur le phytoplancton marin et, d'autre part, d'évaluer la sensibilité des organismes marins vis-à-vis de la toxicité de ces contaminants par une étude comparative de différents bio-essais existants ou développés dans le cadre de cette étude.

Trois micro-algues fourrages (*C. calcitrans, I. aff. galbana et T. suecica*) ont subi, dans différentes conditions de culture, des tests de toxicité de deux contaminants chimiques : le fongicide époxiconazole, utilisé pur et en formulation commerciale Opus et, l'adjuvant nonylphénol. L'analyse des résultats montre que :

- *I. aff. galbana* s'avère plus sensible que *C. calcitrans* et *T. suecica* à l'action de l'époxiconazole pur et du nonylphénol,
- Le fongicide Opus se révèle le contaminant le plus toxique pour les deux micro-algues *C. calcitrans* et *I. aff. Galbana*, avec respectivement des CE_{50} de 4,47 µg/L et 6,46 µg/L en milieu f/2 et de 2,9 µg/L et 4,33 µg/L en milieu G+, milieu reproduisant les conditions naturelles du Golfe de Gabès.

La sensibilité des micro-algues est donc fonction à la fois de l'espèce algale et des conditions de culture utilisées (composition en sels nutritifs et éclairement des cultures) mais aussi du stade physiologique de croissance. Plus le milieu est riche et le temps d'éclairement long et moins la sensibilité de l'algue est grande. Plus l'addition du fongicide au cours de la phase exponentielle de croissance est tardive et moins la réduction de la densité cellulaire observée est importante.

Les contaminants étudiés affectent différemment la division cellulaire et les processus physiologiques. En effet, le fongicide et l'adjuvant induisent des augmentations du volume cellulaire, des vitesses de photosynthèse et de respiration, de la teneur en pigments et en ATP, augmentations qui semblent toutes découler de l'action retardatrice de ces toxiques sur la division cellulaire.

Il ressort donc de cette étude que l'action des contaminants est fonction de nombreux facteurs : concentration et nature du toxique, espèce algale, conditions de culture et stade physiologique de croissance. Il apparaît ainsi que, dans un milieu reproduisant des conditions proches du milieu naturel (composition en sels nutritifs et éclairement), les micro-algues sont plus sensibles à la présence des contaminants que dans le milieu f/2, milieu riche en sels nutritifs ainsi que celui recommandé par la norme ISO 10253 (AFNOR, 1998).

Il est à noter que, l'ordre de grandeur des CE_{50} enregistré dans cette étude est, pour l'époxiconazole (Opus) et le nonylphénol, de l'ordre de quelques µg/L et pour la molécule pure d'époxiconazole, de quelques mg/L. La toxicité plus prononcée du fongicide en formulation commerciale que celle de la molécule pure, pose le problème de la prise en compte des formulations dans l'homologation des substances actives.
Sachant que les teneurs en époxiconazole et en nonylphénol trouvées dans les eaux superficielles marines peuvent varier de quelques ng/L à plusieurs µg/L et, qu'à une concentration en époxiconazole (Opus) de 0,7 µg/L et en nonylphénol de 10 µg/L, une inhibition de la croissance de *C. calcitrans* cultivée dans un milieu proche des conditions naturelles (G+) est observée, on peut considérer que ces contaminants constituent une menace sérieuse pour le plancton et plus globalement pour les écosystèmes.

Par ailleurs, quelles que soient les conditions utilisées, l'effet inhibiteur des contaminants s'atténue au cours de la durée de la culture, cette atténuation pouvant résulter de l'élévation de la densité cellulaire. Cependant, on ne peut exclure que ne se produise la mise en place d'un processus de détoxification ou une dégradation de ces contaminants bien que ces molécules paraissent être relativement stables. Une étude de la détoxification éventuelle de ces composés et/ou de leur métabolisation par les cellules algales, permettrait de mieux comprendre l'atténuation de la toxicité observée au cours

du temps d'exposition ou d'envisager une tolérance accrue sous l'effet d'une pression de sélection.

Cette inhibition transitoire de la division cellulaire de certaines micro-algues, peut avoir des conséquences sur la communauté phytoplanctonique voire l'écosystème tout entier, les micro-algues constituant le premier maillon de la chaîne trophique.

En effet, l'analyse des données obtenues en microcosmes portant sur l'effet des contaminants chimiques [époxiconazole (Opus), chlorpyriphos-éthyl (Dursban) et nonylphénol] sur des populations phytoplanctoniques naturelles provenant de la lagune de Boughrara (golfe de Gabès), montre que l'intégrité de la structure de ces communauté est affectée. Des modifications de la composition spécifique des communautés ont été observées selon le type et la concentration du contaminant.

L'originalité de cette étude réside dans le fait que le prélèvement a été réalisé pendant une période marquée par un épisode de bloom du dinoflagellé toxique *Karenia selliformis* (99 %). Bien que le groupe de Dinophycées se manifeste toujours comme le groupe dominant dans les eaux de la lagune, la présence de contaminants chimiques et plus particulièrement du chlorpyriphos-éthyl-Dursban (5 µg/L) dans l'eau de mer des microcosmes, bouleverse l'équilibre naturel des population naturelles ; en effet, cet insecticide produit une réduction du pourcentage de *K. selliformis* (de 99 à 50 %) et favorise le développement des diatomées, qui passent d'un pourcentage inférieur à 1 % à une valeur de 38 %. L'interprétation des résultats s'avère complexe car, à l'altération de la composition spécifique de la communauté naturelle par les contaminants, s'ajoute un effet inhibiteur exercé par le dinoflagellé *K. selliformis* sur le développement des autres groupes de phytoplancton, présents dans les microcosmes. Une étude de l'action des toxiques sur les communautés phytoplanctoniques naturelles provenant du même site d'étude, en dehors d'un épisode de bloom de *K. selliformis,* pourrait compléter avantageusement ce travail et permettre d'élucider l'action des contaminants sur les groupes de phytoplancton, minoritaires lors de notre étude.

Dans les écosystèmes, les algues constituent les « cibles désignées » de ces contaminants, en raison d'une part, de leur sensibilité intrinsèque et, d'autre part, de

leur rôle de support du réseau trophique aquatique (statut de « producteurs primaires »). En perturbant la physiologie des algues les plus sensibles, qui a pour effet de diminuer leurs capacités compétitives, ces toxiques pourraient exercer une pression de sélection au sein des communautés algales, au profit des espèces les plus tolérantes sans qu'aucun effet létal direct n'intervienne ou ne soit détectable (Bérard et Pelte 1999).

Afin que l'étude ait une signification écologique maximale, l'impact des contaminants chimiques a été évalué sur des espèces d'un niveau trophique supérieur au sein de l'écosystème. Différents stades de développement de quatre animaux marins modèles appartenant à trois niveaux trophiques distincts, à savoir un vertébré le turbot *S. maximus*, un échinoderme l'oursin *P. lividus* et deux mollusques : l'huître creuse *C. gigas* et la palourde japonaise *R. philippinarum*, ont été soumis à l'action des contaminants. Pour la majorité des bio-essais c'est le nonylphénol et le cuivre qui s'avèrent les molécules les plus toxiques. Des différents bio-essais utilisés, c'est la métamorphose des larves de palourde qui se révèle le stade le plus sensible à l'action des contaminants alors que la croissance du naissain de palourde apparaît le moins affecté. Ceci suggère que le stade de développement constitue un élément important pour prédire les effets de l'exposition aux contaminants, les stades de vie les plus précoces montrant une plus grande sensibilité au contaminant. En outre, le développement embryo-larvaire des bivalves et de l'oursin présente des anomalies du développement, allant jusqu'au blocage du développement au stade embryon. L'ensemble de ces bio-essais peut être recommandé pour les études de bio-monitoring sur la qualité des eaux marines.

L'étude de l'action directe des contaminants sur la croissance du naissain de palourde montre qu'en présence des contaminants, une inhibition de la croissance est induite allant jusqu'au blocage total et, selon la concentration en contaminant, la consommation d'algues est réduite ; à faibles doses, ces effets sont observés sur la croissance du naissain de *R. philippinarum*, en présence d'un mélange de deux contaminants (Opus + nonylphénol). En action indirecte, la consommation de l'algue fourragère *I. aff. Galbana*, contaminée par les toxiques, inhibe la croissance du naissain de *R. philippinarum*. De ce fait, une réduction de la population naturelle de filtreurs pourrait être induite par une action i) directe sur le développement embryo-larvaire, la métamorphose et la

croissance et ii) indirecte sur la qualité et la biodisponibilité de l'aliment. Ces effets, observés *in vitro*, pour de faibles concentrations en contaminants, pourraient contribuer aux mortalités ou au manque de recrutement observés en milieu naturel.

L'évaluation écotoxicologique, basée sur l'utilisation de bio-essais pour des organismes de différents niveaux trophiques, en parallèle aux dosages directs des contaminants chimiques, permettraient : i) de rendre compte de la biodisponibilité des contaminants en zone côtière tunisienne, ii) d'adapter et de valider les seuils de toxicité tels que développés en Europe, iii) de définir une meilleure stratégie de gestion du littoral et de préservation des zones non impactées.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

AERMC, 2002. Guide technique N° 7. Pollution toxique et écotoxicologie : notion de base. Lyon : Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse. 84p.

AFNOR, 1998. Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum*. NF EN ISO 10253, T90-311, 8 p.

AFNOR, 2004. Projet de norme internationale : Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum.* Pr EN ISO 10253 : 2004, 13 p.

AFNOR, 2009. Bio-essai d'écotoxicité aquatique sur le développement embryo-larvaire des bivalves. NF T90 XP-283, 17 p.

Agritox : Reference internet : http://www.inra.fr/agritox/index.php

Ahel M., Giger W. and Koch M., 1994. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic anvironment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. Water Research, 28 : 1131-1142.

Akcha F., Arzul G., Rousseau S. and Bardouil M., 2008. Comet assay in phytoplancton as biomarker of genotoxic effects of environmental pollution. Marine Environmental Research, 66 : 59-61.

Akers A., Köhle H. and Gold R.E., 1990. Uptake, transport and mode of action of BAS 480 F, a new triazole fungicide. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. Farnham, UK: British Crop Protection Council, pp. 837 - 845.

Angerville R., 2009. Evaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de Rejets Urbains par Temps de Pluie (RUTP) dans les cours d'eau : Application à une ville française et à une ville haïtienne. Thèse. Spécialité : Sciences de l'Environnement Industriel. Villeurbanne et Vaulx-en-Velin: INSA de Lyon et LSE-ENTPE, 485 p.

Alavanja M.C.R., Hoppin J.A. and Kamel F., 2004. Health effects of chronic pesticide exposure : cancer and neurotoxicity. Annual Review of Public Health, 25 : 155-197.

Ammermann E., Lorenz G., Schelberger K., Wenderoth, K., Sauter H. and Rentzea C., 1992. A broad-spectrum fungicide with a new mode of action. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. Farnham, UK: British Crop Protection Council, pp. 403 – 410.

Anonyme., 2000. Etude de l'amélioration de la qualité de l'eau de la lagune de Boughrara. Rapport Ministère de l'Agriculture. SCET. Tunisie. Eco-Ressources International, 180 p.

Arzul G., Erard-Le Denn E., Videau C., Jegou A.M. and Gentien P., 1993. Diatom growth repressing factors during an offshore bloom of *Gymnodinium* cf. *aureolum*. In : Smayda T., Shimizu Y. (Eds). Toxic Phytoplancton Blooms in the Sea. Proceedings of the fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplancton. Elsevier, New York, pp. 719-724.

Arzul G., Quiniou F., Videau C. et Durand G., 2008. La toxicité des pesticides varie selon le stade de développement des cultures de phytoplancton au moment de leur exposition. Poster GFP, Brest.

Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M., (éditeurs), 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique collective, synthèse du rapport, INRA et Cemagref (France), 64 p.

Auby I., Maurer D., 2004. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Rapport final Ifremer, 327p.

Aust G.F. Wilkinson S., Dunn M., Glass R. and Williams F.M., 2007. Influence of formulation on the dermal absorption of pesticide actives at spray dilution concentrations. Abstracts / Toxicology, 231 : 112-113.

-B-

Bachvoroff T.R., Adolf J.E. and Place A.R., 2009. Strain variation in *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae) : toxin profiles, pigments, and growth characteristics. Journal of Phycology, 45 : 137-153.

Bahrouni H., 2010. Caractérisation de l'efficacité technique des systèmes de pulvérisation et des pertes de pesticides appliqués aux cultures basses dans les régions méditerranéennes : cas de la Tunisie. Thèse. Spécialité Génie des procédés. Montpellier SupAgro et INAT, 139 p.

Bai S. and Chaney W., 2001. Gibberellin synthesis inhibitors affect electron transport in plant mitochondria. Plant Growth Regulation, 35 : 257-262.

Bailey H.C., Miller J.L., Wiborg L.C., Deanovic L. and Shed T., 1997. Joint acute toxicity of diazinon and chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology & Chemistry, 16 : 2304-2308.

Baldwin W.S., Graham S.E., Shea D. and LeBlanc G.A., 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. Environmental Toxicology & Chemistry, 16 : 1905-1911.Baird T.D. and DeLorenzo M.E., 2010. Descriptive and mechanistic toxicity of conazole fungicides using the model test alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). Environmental Toxicology, 25 : 213-220.

Ballantyne B., 2004. Toxicology of fungicides. In Marrs T.C., Ballantyne B., editors. Pesticide Toxicology International Regulation. Chicester, West Sussex, England : Wiley, pp 249-261.

Baninasab B., 2009. Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. Scientia Horticulturae, 121 : 144-148.

Barata C., Solayan A. and Porte C., 2004. Role of β-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. Aqatic Toxicology, 66 : 125-139.

Bayed A. Quiniou F., Benrha A., and Guillou M., 2005. The Paracentrotus lividus populations from the northern Moroccan Atlantic coast : growth, reproduction and health condition. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom, 85 : 999-1007.

Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves Ruditapes decussatus and Mytilus galloprovincialis by trace metals: implications for the implementation of seawater quality criteria. Aquaculture 230: 205–213.

Beiras R. and His E., 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. Marine Ecology Progressive Series, 113 : 95-103.

Beiras R. and His E., 1995. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. Marine Ecology Progressive Series, 126 : 185-189.

Bellas J., Saco-Alvarez L., Nieto O. and Beiras R., 2008. Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. Marine Pollution Bulletin, 57 : 493-502.

Bendschneider K. and Robinson R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. Journal of Marine Research, 11 : 87-96.

Bennie D.T., 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. Water Quality Research Journal of Canada, 34 : 79-122.

Benrejeb-Jenhani A. et Romdhane M.S., 2002. Impact des perturbations anthropiques sur l'evolution du phytoplancton de la lagune de boughrara, (Tunisie). Bulletin de l'Institut Nationale des Sciences et Technologies de la Mer de Salammbô, 29 : 65-75.

Benton J.M. and Cobb A.H., 1995. The plant growth regulator activity of the fungicide, epoxiconazole, on *Galium aparine* L. (Cleavers). Plant Growth Regulation, 17 : 149-155.

Benton J.M. and Cobb A.H., 1997. The modification of phytosterol profiles and *in vitro* photosynthetic electron transport of *Galium aparine* L. (Cleavers) treated with the fungicide, epoxiconazole. Plant Growth Regulation, 22 : 93-100.

Bensouissi J., Trigui El Menif N. Mahjoub M.S., Mejri H. Capape C. et Zaouali J., 2005. New marine exotic species in the tunisian waters. Proceedings, MEDCOAST, V(1), 529-540.

Bérard A. and Pelte T., 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II, effets sur les communautés algales et leur dynamique. Revue des Sciences de l'Eau., 12 : 333-361.

Bérard A., Leboulanger C. and Pelte T., 1999. Seasonal and temperature dependence of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann tolerance to atrazine among natural phytoplancton populations and in pure culture. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 37 : 472-479.

Bergholtz T., Daugbjerg N. and Moestrup Ø., 2005. On the identification of *Karlodinium veneficum* and description of *Karlodinium armiger* sp. Nov. (Dinophyceae), based on light and electron microscopy, nuclear-encoded LSU rDNA, and pigment composition. Journal of Phycology, 42 : 170-193.

Bertelsen J.R., de Neergaard E. and Smedegaard-Petersen V., 2001. Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. Plant Pathology, 50 : 190-205.

Biré R., Krys S., Frémy J.M., Dragacci S. and Kharat R., 2002. First evidence on occurrence of gymnodimine in clams from tunisia. J. Nat. Toxins, 11 : 252-258.

Blackburn M.A. and Waldock M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. Water Research, 29 : 1623-1629.

Blanquer, A. Alayse, J.P. Rkhami B.O. and Berrebi, P., 1992. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill *Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes,

Pleuronectoformes, *Scophthalmidae*) through their range in Europe. Journal of Fish Biology, 41 : 725-736.

Bonfanti P., Colombo A., Orsi F., Nizzetto I., Andrioletti M., Bachetta R., Mantecca P., Fascio U., Vailati G. and Vismara C., 2004. Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *XenOpus laevis* development. Aquatic Toxicology, 70 : 189-200.

Boumaiza M., Ktari M.H. and Vitiello P., 1979. Toxicity of several pesticides used in Tunisia, for *Aphanius fasciatus Nardo*, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae). Arch. Inst. Pasteur, Tunis 56 (3) : 307-342.

Bradley P.M., Barber L.B., Kolpin D.W., McMahon P.B. and Chapelle F.H., 2008. Potential for 4-n-nonylphenol biodegradation in stream sediments. Environmental Toxicology & Chemistry, 27 : 260-265.

Brock T.C.M., van den Bogaert, Bos A.R., van Breukelen S.W.F., Reiche R., Terwoert J., Suykerbuyk R.E.M. and Roijackers R.M.M., 1992. Fate and effects of the insecticide Dursban 4e in indoor *Elodea*-dominated and macrophyte-free freshwater model ecosystems : I. Secondary effects on community structure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 23 : 391-409.

Bromilow R.H., Evans A.A. and Nicholls P.H., 1999. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types : 2. Field studies. Pesticide Science, 55 : 1135-1142.

Brown R.J., Conradi M. and Depledge M.H., 1999. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). The Science of the Total Environment, 233 : 77-88.

Brunet C., 2000. Effets interactifs d'une forte charge en éléments nutritifs et de la vitesse du courant sur la communauté périphytique : étude en canaux artificiels. Thèse. Spécialité : Analyse et modélisation des systèmes biologiques. Université Claude Bernard, Lyon 1, 186p.

Buchwalter D.B., Sandahl J.F., Jenkins J.J. and Curtis L.R., 2004. Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in fourth instar *Chironomous riparius* (Meigen). Aquatic Toxicology, 66 : 149-157.

Buerge I.J., Poiger T., Müller M.D. and Buser H.R., 2006. Influence of pH on the stereoselective degradation of the fungicides epoxiconazole and cyproconazole in soils. Environmental Science and Technology, 40 : 5443-5450.

-C-

Cairns Jr J., Niederlehner B. R. et Pratt J. R., 1990, Evaluation of joint toxicity of chlorine and ammonia to aquatic communities. Aquatic Toxicology, 16 : 87-100.

Cairns Jr J. and Cherry D. S., 1993. Freshwater multi-species test systems. In : Calow P., Handbook of ecotoxicology, Vol. 1. Oxford : Blackwell Scientific Publications. 101-116 p.

Cairns Jr J., Bidwell J. R. et Arnegard M. E., 1996. Toxicity testing with communities: microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 147 : 45-69.

Cakal Arslan O. and Parlak H., 2007. Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin (*Arbacia lixula*). Ecotoxicology, 16 : 439-444.

Calow P., 1993, General principles and overviews. In : Calow P., Handbook of ecotoxicology, Vol. 1. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1-5.

Campbell P.M. and Hutchinson T.H., 1998. Wildlife and endocrine disrupters : requirement for hazard identification. Environmental Toxicology and Chemistry, 17 : 127-135.

Canesi L., Lorusso L.C., Ciatti C., Betti M., Zampini M. and Gallo G., 2004. Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. General and Comparative Endocrinology, 138 : 58-69.

Caquet T., Lagadic L., Jonot O., Baturo W., Kilanda M., Simon P., Le Bras S., Echaubard M. and Ramade F., 1996. Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. Ecotoxicological and Environmental Safety, 34 : 125-133

Carpenter S. R., 1996. Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. Ecology, 77 : 677-680

Caux P.Y. and Kent R.A., 1995. Towards the development of a site-specific water objective for atrazine in Yamaska river, Quebec, for the protection of aquatic life. Water Quality Research Journal of Canada, 30 : 157-178.

Caux P. Y., Ménard L., and Kent R. A., 1996. Comparative study of the effects of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. Environmental Pollution, 92 : 219-225.

Cauzzi N., 2007. Evaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités et non traités par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière - Etude en microcosmes aquatiques. Thèse. Spécialité : Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne et Vaulx-en-Velin: INSA de Lyon et LSE-ENTPE, 341p.

Chapman P.M. and Morgan J.D., 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 31 : 438-444.

Cherbonnier G., 1956. Les Echinodermes de Tunisie. Bull. Station Océanographique de Salammbô, N° 53.

Chindah A.C., Sikoki F.D. and Vincent-Akpu I., 2004. Toxicity of an organophosphate pesticide (chlorpyrifos) on a common Niger Delta wetland fish *Tilapia Guineensis* (Blecker 1862). Journal of Applied Sciences and Enviromental Management, 8 : 11-17.

Chora S., McDonagh B., Sheehan D., Starita-Geribaldi M. and Roméo M., 2010. Ubiquitination and carbonylation of proteins in the clam *Ruditapes decussatus*, exposed to nonylphenol using redox proteomics. Chemosphere, 81 : 1212-1217.

Chrétiennot-Dinet M.J., 1990. Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Cryptophycées, Euglénophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnésiophycées, Rhodophycées et Tribophycées. Atlas du phytoplancton marin. Vol. 3. A. Sournia (Ed). Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris., 261 p.

Christiansen S., Boberg J., Nelleman C., Axelstad M., Jacobsen P.R. and Hass U., 2010. A cocktail of endocrine disrupting pesticides affects sexual differentiation in rats. Free communication / Reproductive Toxicology, 30 : 229.

Clément B. et Cadier C., 1998, Development of a new laboratory freshwater/sediment microcosm test. Ecotoxicology, 7 : 279-290.

Clément B., Cauzzi N., Godde M., Crozet K. et Chevron N., 2005. Pyrene toxicity to aquatic pelagic and benthic organisms in single-species and microcosm tests. Polycyclic Aromatic Compounds, 25 : 271-298.

Clément B., 2006. Apports des essais en microcosmes aquatiques lentiques de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire d'HDR. Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées Villeurbanne, Lyon, Vaulx-en-Velin : INSA de Lyon et Université Lyon 1, LSE-ENTPE, 277 p.

Colin, F., 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas du bassin du Sousson (Gers, France) : 152 p.

Colombo R., Cerana R. and Lado P., 1991. Effect of penconazole and flusilasol on the tonoplast of *Acer pseudoplatanus* cells. Plant Science, 76 : 167-174.

Čolović M.B., Krstić D.Z. , Uščumlić G.S. and Vasić V.M., 2011. Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100 : 16-22.

Colville A., Jones P., Pablo F., Hose G. and Lim R., 2008. Effects of chlorpyrifos on macroinvertebrate communities in coastal stream mesocosms. Ecotoxicology, 17 : 173-180.

Correa-Reyes, G., Viana, M.T., Marquez-Rocha, F.J., Licea, A.F., Ponce, E. and Vazquez-Duhalt, R., 2007. Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. Chemosphere, 68 : 662-670.

Corsi I. and Focardi S., 2002. Nonylphenols in a lagoon environment : *p*-nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in fish tissue. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68 : 908-914.

Coscollà C., Colin P., Yahyaoui A., Petrique O., Yusà V., Mellouki A. and Pastor A., 2010. Occurrence of currently used pesticides in ambient air of Centre Region (France). Atmospheric Environment, 44 : 3915-3925.

Coupe R.H. and Blomquist J.D., 2004. Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies. J. AWWA. 96 : 56-58.

Creton S., Douglas M., Wheeler J.R. and Hutchinson T., 2010. Challenging the requirement for chronic fish toxicity studies on formulated plant protection products.Toxicology Letters, 199 : 111-114.

Crossland N. O. et Bennett D., 1984. Fate and biological effects of methyl parathion in outdoor ponds and laboratory aquaria - I. Fate. Ecotoxicological and Environmental Safety, 8 : 471-481.

Crossland N. O. et La Point T. W., 1992. The design of mesocosm experiment. Environmental Toxicology & Chemistry, 11 : 1-4.

Crouch I.J. and van Staden J., 1993. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. Plant Growth Regulation, 23 : 21-29.

-D-

Dachs J., Van Ry D.A. and Eisenreich S.J., 1999. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of lower Hudson River estuary. Environmental Science and Technology, 33 : 2676-2679.

Dam K., Seidler F.J. and Slotkin T.A., 1998. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos : delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. Developmental Brain Research, 108 : 39-45.

Dam K., Garcia S.J., Seidler F.J. and Slotkin T.A., 1999. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. Developmental Brain Research, 116 : 9-20.

Dannenberg A. and Pehkonen S.O., 1998. Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46 : 325-334.

Deeds J.R., Terlizzi D.E., Adolf J.E., Stoecker D.K. and Place A.R., 2002. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (=*Gymnodinium galatheanum*) (Dinophyceae) a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. Harmful algae, 1 : 169-189.

Delaunay F., Marty Y., Moal J. and Samain J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 173 : 163-179.

Demir F., Uzun F.G., Durak D. and Kalender Y., 2011. Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. Pesticide Biochemistry and Physiology, 99 : 77-81.

Déniel C., 1973. Nutrition et croissance du jeune turbot *Scophthalmus maximus* L. (Téléostéens-Bothidae). Thèse de 3ème cycle : Océanographie biologie. 149 p.

Do Hong L. C., 2001. Development and validation of bioassay for the ecotoxicologial risk assessment of tropical fresh water systems. Thèse. Lausanne : Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. 125 p + Annexes

Domico L.M., Zeevalk G.D., Bernard L.P. and Cooper K.R., 2006. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. NeuroToxicology, 27 : 816-825.

Domico L.M., Cooper K.R., Bernard L.P. and Zeevalk G.D., 2007. Reactive oxygen species generation by the ethylene-*bis*-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. NeuroToxicology, 28 : 1079-1091.

Doran W.J., Cope W.G., Rada R.G. and Sandheinrich M.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblema plicata*) by chlorpyriphos : implications for biomonitoring. Ecotoxicological and Environmental Safety, 49 : 91-98.

Dosnon-Olette R., Trotel-Aziz P., Couderchet M. and Eulaffroy P., 2010. Fungicides and herbicide removal in *Scenedesmus* cell suspensions. Chemosphere, 79 : 117-123.

Drira Z., Hamza A., Belhassen M., Ayadi H., Bouaïn A. and Aleya L., 2008. Dynamics of dinoflagellates and environmental factors during the summer in the Gulf of Gabès (Tunisia, Eastern Mediterranean Sea). Scientia Marina, 72 : 59-71.

-E-

Echeveste P., Agusti S. and Dachs J., 2010. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplancton populations. Environmental Pollution, 158 : 299-307.

EFSA, 2008. Conclusion on the peer review of epoxiconazole. Sci. Rep., 138 : 1-80.

Ekelund R., Bergman A., Granmo A. and Berggren M., 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals, a re-evaluation. Environmental Pollution, 64 : 107-120.

Ekelund R., Granmo A., Magnusson K., Berggren M. and Bergman A., 1993. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. Environnemtal Pollution, 79 : 59-61.

Ennaceur, S., Drissa, M. R., N., G., 2004. Evaluation des résidus de pesticides organochlorés dans le lait maternel de deux régions de la tunisie. Revue maghrébine de pédiatrie 14 (05) : 255-262.

EPA, US Environmental Protection Agency, 2000. Registration eligibility science chapter for chlorpyrifos : fate and environmental assessment chapter. 94p.

-F-

Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : intérêt pour le contrôle de la reproduction en écloserie. Université de Bretagne Occidentale. 219 p.

FA0, 2005. Programme *Ruditapes philippinarum*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/fr.

Farahat F.M., Fenske R.A., Olson J.R., Galvin K., Bonner M.R., Rohlman D.S., Farahat T.M., Lein P.J. and Anger W.K., 2010. Chlorpyriphos exposures in egyptian cotton field workers. NeuroToxicology, 31 : 297-304.

Feki W., Hamza A., Bel Hassen M. et Rebai A., 2008. Les efflorescences phytoplanctoniques dans le golfe de Gabès (Tunisie) au cours de dix ans de surveillance (1995-2005). Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô. 35 : 105-116.

Fenaux., L., 1968. Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus microtuberculatus* (Echinides) à Villefranche-sur –mer. Vie. Milieu, Fr., A 19 (1) : 1-52.

Fernández N. et Beiras R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. Ecotoxicology, 10 : 263-271.

Fleeger J.W., Carman K.R. and Nisbet R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. The Science of the Total Environment, 317 : 207-233.

Fletcher R.A., Gill A., Davis T.D. and Sankhla N., 2000. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Horticultural Reviews, 24 : 55-138.

Fliedner A. et Klein W., 1996. Effects of lindane on the planktonic community in freshwater microcosms. Ecotoxicological and Environmental Safety, 33 : 228-235

Forbes V. E. et Forbes T. L., 1997. Ecotoxicologie - Théorie et applications. Paris : INRA Editions. 256p.

Foxenberg R.J., Ellison C.A., Knaak J.B., Ma C. and Olson J.R., 2011. Cytochrome P450-specific human PBPK/PD models for the organophosphorus pesticides : chlorpyrifos and parathion. Toxicology, 285 : 57-66.

Friberg-Jensen U., Wendt-Rasch L., Woin P. and Christoffersen K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. Aquatic Toxicology, 63 : 357-371.

-G-

Gadher P., Mercer E. J., Baldwin B.C. and Wiggins T.E., 1983. A comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14-demethylation. Pesticide Biochemistry and Physiology, 19 : 1-10.

Gala W.R. and Giesy J.P., 1993. Using the carotenoid biosynthesis inhibiting herbicide, fluridone, to investigate the ability of carotenoid pigments to protect algae from the photo-induced toxicity of anthracene. Aquatic Toxicology, 27 : 61-70.

Galtsoff P.S., 1964. The american oyster *Crassostrea virginica* (G.). Fish. Bull. U.S. 64: 1-480.

Gao Q.T. and Tam N.F.Y., 2011. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. Chemosphere, 82 : 346-54.

Garcia-Lavandeira M., Silva A., Abad M., J. Pazos A., L. Sanchez J., Perez-Paralle M.L., 2005. Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 316 : 149–156.

Garric J., Migeon B. and Vindimian E., 1990. Lethal effects of draining on brown trout. A predictive model based on field and laboratory studies. Water Research, 24 : 59-65.

Geffard O., His E., Budzinski H., Seaman M. et Garrigues P., 2001. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie. 324 : 1149-1155.

Gentien P. and Arzul G., 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium* cf. *aureolum* (Dynophyceae). Journal of Marine Biological Association of United Kingdom, 70 : 571-581.

Gérard A., Naciri-Graven Y., Boudry P., Launay S., Heurtebise C., Ledu C., Phelipot P., 1995. Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relation entre reproduction et génétique. La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France, Nantes (France), 14-15 Nov 1995. IFREMER Rapp. Interne DRV/RA/RST/ 97-11 RA/Brest, 99-112.

Giuckert B. J., 1996. Toxicity assessment by community analysis. Journal of Microbiological Methods, 25 : 101-112.

Gomes J., Dawodu A.H., Lloyd O., Rewitt D.M. and Anilal S.V., 1999. Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. Human Experimental Toxicology, 18 : 33-37.

Graebe J.E., 1987. Gibberellin biosynthesis and control. Annual Review of Plant Physiology, 38 : 419-465.

Granmo A., Ekelund R., Magnusson K. and Berggren M., 1989. Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel (*Mytilus edulis* L.). Environmental Pollution, 59 : 115-127.

Granmo A., Ekelund R., Berggren M. and Magnusson K., 1991. Toxicity of 4-nonylphenol to aquatic organisms and potential for bioacculation. p.53-75. Proceedings of a seminar on nonylphenolethoxylates (NPE) and nonylphenol (NP), Stockholm, Ingvar Bingham.

Griffin P., Mason H., Heywood K. and Cocker J., 1999. Oral and dermal absorption of chlorpyriphos : a human volunteer study. Occupational and Environmental Medecine, 56 : 10-13.

Griffin P., Payne M., Mason H., Freelander E., Curran A.D. and Cocker J., 2000. The *in vitro* percutaneous penetration of chlorpyriphos. Human and Experimental Toxicology, 19 : 104-107.

Grossmann K., Weiler E.W. and Jung J., 1985. Effects of different sterols on the inhibition of cell culture growth caused by the growth retardant tetcyclacis. Planta, 164 : 370-375.

Grossmann K., Schmidt H.O. and Jung J., 1986. Changes in membrane permeability and mineral, phytohormone and polypeptide composition in rice suspension cells during growth and under the influence of the growth retardant tetcyclacis. Plant Cell Reports, 5 : 315-318.

Grote K., Niemann L., Selzsam B., Haider W., Gericke C., Herzler M. and Chahoud I., 2008. Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Environmental Toxicology and Chemistry, 27 : 2368-2374.

Guida M., Mafalda I. and Meriç S., 2008. A multi-battery toxicity investigation on fungicides. Desalination, 226 : 262-270.

Guillard R.R.L. and Ryther J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Canadian Journal of Microbiology, 8 : 229-239.

Guillou M, Quiniou F., Huart B., Pagano G., 2000. Comparison of embryonic development and metal contamination in several populations of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck) exposed to anthropogenic pollution. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 39 :337-344.

Gul A., 2005. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos on Nile tilapia *Oreochomis niloticus* larvae. Chemosphere, 59 : 163-166.

-H-

Hageman K.J., Simonich S.L., Campbell D.H., Wilson G.R. and Landers D.H., 2006. Atmospheric deposition of current-use and historic-use pesticides in snow at national parks in the Western United States. Environmental Science and Technology, 40 : 3174-3180.

Hamza A. et El Abed A., 1994. Les eaux colorées dans le golfe de Gabès : bilan de six ans de surveillance (1989-1994). Bull . Inst. Nat. Scie. Tech. Mer., 21 : 66-72.

Hamza A., Bouain A. et El Abed A., 1999. Le *Gymnodium* sp phytoplancton toxique du golfe de Gabès. Bull . Inst. Nat. Scie. Tech. Mer., 4 : 49-51.

Hamza, M. H., Added, A., Ben Mammou, A., Abdeljaoued, S., Rodriguez, C. R., 2004. Evaluation de la vulnérabilité à la pollution potentielle par les pesticides, de la nappe côtière alluvionnaire de la plaine de metline-ras jebel-raf raf, nord-est

tunisien, selon la méthode drastic appliquée par les systèmes d'information. Houille blanche, Coden Hoblab 05 : 86-94.

Hansen G., Erard-Le Denn E., Daugbjerg N. and Rodriguez F., 2004. *Karenia selliformis* responsible for the fish-kills in the Gulf of Gabès, Tunisia., 1994. Ifremer.

Hansen P.R, Christiansen S., Boberg J., Nellemann C. and Hass U., 2009. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition and causes pup mortality in rats. Abstracts / Reproductive Toxicology, 28 : 132.

Haubruge E. et Amichot M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 2 : 161-174.

Haughan P.A., Lenton J.R. and Goad L.J., 1988. Sterol requirements and paclobutrazol inhibition of a celery cell culture. Phytochemistry, 27 : 2491-2500.

Haughan P.A., Burden R.S., Lenton J.R. and Goad L.J., 1989. Inhibition of celery growth and sterol biosynthesis by the enantiomers of paclobutrazol. Phytochemistry, 28 : 781-787.

Haywood A.J., Steidinger K.A. and Truby E.A., 2004. Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand. Journal of Phycology, 40 : 165-179.

HC-SC, Health Canada. Santé Canada., 1989. Le chlorpyrifos. 3 p. (http///www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/doc-sup-appui/chlorpyrifos/chlorpyrifos_f.pdf).

Heemken O.P., Reincke H., Stachel B. and Theobald N., 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. Chemosphere, 45 : 245-259.

Hickley C. W., Golding L. A., Martin M. L. et Croker G. F., 1999, Chronic toxicity of ammonia to New Zealand freshwater invertebrates : a mesocosm study. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 37 : 338-351

His E., Budzinski H., Geffard O. and Beiras R., 1997a. Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie, 320 : 797-803.

His E., Seaman, M.N.L. and Beiras R., 1997b. A simplification of the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. Water Research, 31 : 351-355.

His E., Beiras. R, and Seaman. M., 1999. The assessment of marine pollution - Bioassays with bivalve embryos and larvae. Advances in Marine Biology, 37 : 1-178. Academic Press , London, 178p.

Hoe Chang F., 2011. Toxic effects of three closely-related dinoflagellates, *Karenia concordia*, *K. brevisulcata* and *K. mikimotoi* (Gymnodiniales, Dinophyceae) on other microalgal species. Harmful Algae, 10 : 181-187.

Holmes B., 2010. Weed resistance could mean herbicide is futile. New Scientist, 206 : 12.

Hong L. and Li M.H., 2007. Acute toxicity of 4-nonylphenol to aquatic invertebrates in Taiwan. Bull. Environ. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 78 : 445-449.

Hourmant A., Amara A., Pouline P., Durand G., Arzul G. and Quiniou F., 2009. Effect of bentazon on growth and physiological responses of marine diatom : *Chaetoceros gracilis*. Toxicology, Mechanisms and Methods, 19 : 109-115.

Hurlbert S.H., Mulla M.S. and Wilson H.R., 1972. Effect of an organo-phosphorus insecticide on the phytoplancton, zooplancton and insect populations of fresh-water ponds. Ecological Monographs, 42 : 269-299.

-I-

IFEN, 2002. Les pesticides dans les eaux : bilan annuel 2002. Etudes et travaux IFEN n° 36, 25 p. (http//www.ifen.fr/publications/ET/pdf/et36.pdf).

INERIS, 2005. Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation, synthèse du comité de pilotage Verneuil-en-Halatte, Oise. Tech. Rep., INERIS, France.

INERIS, 2009. Perturbateurs endocriniens et biosurveillance des milieux aquatiques. INERIS, France. Tech. Rep., 14 p.

INS, 2008. Rapport annuel 2007. Tech. Rep., Institut National des Statistiques.

-J-

Jaleel C.A. and Gopi R., 2007. Responses of antioxidant defence system of *Catharanthus roseus* (L.) G Don. to paclobutrazol treatment under salinity. Acta Physiologiae Plantarum, 29 : 205-209.

Jaleel C.A., Gopi R., Kishorekumar A., Maivannan P., Sankar B. and Panneerselvam R., 2008. Interactive effects of triadimefon and salt stress on antioxidative status and ajamalcine accumulation in *Catharanthus roseus*. Acta Physiologiae Plantarum, 30 : 287-292.

Jamil K., Shaik A.P., Mahboob M. and Krishna D., 2004. Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyrifos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes *in-vitro*. Drug and Chemical Toxicology, 27 : 133-144.

Janssen C. R. et Persoone G., 1993. Rapid toxicity screening tests for aquatic biota: 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 12 : 711-717

Jeffrey S.W. and Humphrey G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural populations. Biochemie und Physiology der Pflanzen, 167 : 191-194.

Jennings R.C., 1968. Gibberellins as endogenous growth regulators in green and brown algae. Planta, 80 : 34-42.

Johnston R., 1963. Effects of gibberellins on marine algae in mixed culture. Limnology and Oceanography, 8 : 270-275.

JRC., 2002. European Union Risk Assessment Report, 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol.

-K-

Kallal, Z., Alguemi, C., Ghattas, A., 1990. Problématique des résidus des pesticides dans les aliments. In : Séminaire africain sur les pesticides. Institut national de nutrition de tunis 7-12 mai 1990.

Kamel F., Engel L.S., Gladen B.C., Hoppin J.A., Alavanja M.C.R. and Sandler D.P., 2007. Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the agricultural health study. Human and Experimental Toxicology, 26 : 243-250.

Kielak E., Sempruch C., Mioduszewska H., Klocek J. and Leszczyński B., 2011. Phytotoxicity of roundup ultra 360 SL in aquatic ecosystems : biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. Pesticide Biochemistry and Physiology, 99 : 237-243.

Kimball K. D. et Levin S. A., 1985, Limitations of laboratory bioassays : the need for ecosystem level testing. BioScience, 35 : 165-171

Kjaerstad M.B., Taxvig C., Nellemann C., Vinggaard A.M. and Andersen H.E., 2010. Endocrine disrupting effects *in vitro* of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. Reproductive Toxicology, 30 : 573-582.

Knopper L.D. and Lean D.R.S., 2004. Carcinogenic and genotoxic potential of turf pesticides commonly used on golf courses. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 7 : 267-279.

Koroleff F., 1969. Direct determination of ammonia in natural water as indophenol blue. Int. Counc. Explor. Sea Comm. Meet. (Hydrography Comm.) C9 : 1-6.

Koroleff F., 1976. Total and organic nitrogen. *In* K. Grasshoff [ed.]. Methods of seawater analysis. Verlag Chem., 167-181

Kralj M.B., Franko M. and Trebše P., 2007. Photodegradation of organophosphorus insecticides. Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AchE-thermal lens spectometry bioassay. Chemosphere, 67 : 99-107.

Kreutzweiser D. P., Capell S. S. and Sousa B. C., 1995. Hexazinone effects on stream periphyton and invertebrate communities. Environmental Toxicology & Chemistry, 14 : 1521-1527.

Kudo C., Wada K., Masuda T., Yonemura T., Shibuya A., Fujimoto Y., Nakajima A., Niwa H. and Kamisaki Y., 2004. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the cascade caspase and regulation of the cell cycle. Journal of Neurochemistry, 88 : 1416-1423.

Kuo C.C., Kuo D.H., Huang C.J., Fang Y.C., Shieh P., Chen F.A., Shaw C.F. and Jan C.R., 2010. Nonylphenol-induced apoptotic pathways in SCM1 human gastric cancer cells. Drug Development Research, 71 : 139-148.

Kushmaro A., Henning G., Hofmann D.K. and Benayahu Y, 1997. Metamorphosis of *Heteroxenia fuscescens* Planulae (Cnidaria: Octocorallia) is inhibited by crude oil : a novel short term toxicity bioassay. Marine Environmental Research, 43 : 295-302.

Kwok I.M.Y. and Loeffler R.T., 1993. The biochemical mode of action of some newer azole fungicides. Pesticide Science, 39 : 1-11.

-L-

Lango Reynoso F., Devauchelle N., Le Pennec M., Hatt P.J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, Crassostrea gigas, from the "Rade de Brest", France. Invertebrate reproduction and development, 36 (1-3) : 141-144.

Lassus P., Bogé G., Gentien P., Loarer R., Pagano. G. et Quiniou. F., 1990. Toxicité des rejets urbains. Colloque Rejets Urbains. IFREMER Actes de colloques, 11 : 171-186.

Laughlin R.B.L., Jr, Gustafson R.. and Pendolev P., 1988. Chronic embryo-larval toxicity of tributyltin (TBT) to the hard shell clam *Mercenaria mercenaria*. Marine Ecology, 48 : 29-36.

Leboulanger C., Rimet F., de Lacotte M.H. and Bérard A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. Environment International, 26 : 131-135.

Leroux P., 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. C. R.Acad. Sci. Paris, Biologies, 326 : 9-21.

Le Treut Y., 1986. La Palourde. Anatomie. Biologie. Élevage. Pêche. Consommation. Inspection Sanitaire. Thèse en Doctorat Vétérinaire. École Nationale Vétérinaire de Nantes., 162 p.

Levitt J., 1980. Responses of plants to environmental stress. Vol. II, 2nd Ed.. Academic Press, New York, NY. 78-85. ISBN 0-12-445502-8.

L'Hermite N., Gouzy A., Le Gall A.C., Bedos C. et B. Bonicelli, 2008. Identification et hiérarchisation des pesticides préoccupants sur le plan de la santé et de l'environnement. Approche pour le compartiment aérien : *Sph'Air***.** In : Congrés nationale du Groupe Françcais des Pesticides. Brest 21-23 mai.

Lhoste, J. and Grison P., 1989. La Phytopharmacie française chronique historique. Paris, INRA.

Li D., Dong M., Shim W.J., Yim U.H., Hong S.H. and Kannan N., 2008. Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. Chemosphere, 71 : 1162-1172.

Liber K., Knuth M.L. and Stay F.S., 1999. An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in an experiment littoral ecosystem. Environmental Toxicology & Chemistry, 18 : 357-362.

Lin H.T., Wong S.S. and Li G.C., 2001. Dissipation of epoxiconazole in the paddy field under subtropical conditions of Taiwan. Journal of Environmental Science and Health, B36 : 409-420.

Lin K.H., Tsou C.C., Hwang S.Y., Chen L.F.O. and Lo H.F., 2006. Paclobutrazol pre-treatment enhanced flooding tolerance of sweet potato. Journal of Plant Physiology, 163 : 750-760.

Lindsay S., Chasse J., Butler R.A., Morrill W. and Van Beneden R.J., 2010. Impacts of stage-specific acute pesticide exposure on predicted population structure of the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Aquatic Toxicology, 98 : 265–274.

Lipok J., Studnik H. and Gruyaert S., 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents : Glyphosate and isopropylamine towards non-target photoautotrophs. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73 : 1681-1688.

Liu Y., Guan Y., Gao Q., Tam N.F.Y. and Zhu W., 2010. Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. Chemosphere, 80 : 592-599.

Liu Y., Tam N.F.Y., Guan Y., Yasojima M., Zhou J. and Gao B., 2011. Acute toxicity of nonylphenols and bisphenol A to the embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. Ecotoxicology, 20 : 1233-1245.

Lopes I., Moreira-Santos M., da Silva E. M., Sousa J. P., Guilhermino L., Soares A. M. V. M. et Ribeiro R., 2007. *In situ* assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. Chemosphere, 67 : 2250-2256.

Lopes F.M., Batista K.A., Batista G.L., Mitidieri S., Bataus L.A. and Fernandes K.F., 2009. Biodegradation of epoxyconazole and piraclostrobin fungicides by *Klebsiella* sp. from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10.1007/s11274-009-02830.

Lorenzo J.I., Nieto O., Beiras R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. Aquatic Toxicology, 59 : 27-41.

Lorenzen C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments : spectrophotometric equations. Limnology and Oceanography, 12 : 343–346.

Lorraine-Colwill D.F., Powles S.B., Hawkes S.B., Hollinshead P.H., Warner S.A.J. and Preston C., 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 74 : 62-72.

Lubet P.E., 1981. Influence des facteurs externes sur la reproduction des Lamellibranches. Oceanis, 6 (5) : 469-489.

Lukaszewicz-Hussain A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity. Short review. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98 : 145-150.

Lussier S.M., Champlin D., LiVolsi J., Poucher S. and Pruell R.J., 2000. Acute toxicity of para-nonylphenol to saltwater animals. Environmental Toxicology and Chemistry, 19 : 617-621.

-M-

Ma. J., Zheng R., Xu L. and Wang S., 2002. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliqnus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. Ecotoxicology and Environmental Safety, 52 : 57-61.

Ma J., Lin F., Zhang R., Yu W. and Lu N., 2004. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*, to 14 pesticide adjuvants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 58 : 61-67.

Maguire R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. Water Quality Research Journal of Canada, 34 : 37-78.

Mann R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom, 59 : 95-110.

Mansour, H., Daly, L., Rammeh, H., Hidri, A., Trigui, M., Mahmoud, A., Chakroune, R., Hédhili, A., Kahouach, L., Nouaigui, H. and Laiba, M., 2003. Etude de l'utilisation des pesticides en milieu professionnel en tunisie. L'Institut tunisien de Santé et de Sécurité au Travail, http ://www.isst.nat.tn/fr/etudes/pesticides.htm.

Margni M., Rossier D. , Crettaz P. and Jolliet O., 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment, 93 : 379-392.

Martin M., Osborn P., Billig, K.E. and Glickstein N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Marine Pollution Bulletin, 12 : 305-308.

Martin Tsui T.K. and Chu L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere, 52 : 1189–1197.

Matozzo V., Deppieri M., Moschino V. and Marin M.G., 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. Environmental Research, 91 : 179-185.

Medhioub M.N., 1993. Aperçu sur la conchyliculture en Tunisie point de situation et réflexions. Revue de l'Institut National Agronomique de Tunisie, 8 : 19-26.

Mehta A., Verma R.S. and Srivastava N., 2009. Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. Pesticide Biochemistry and Physiology, 94 : 55-59.

Merlin G., Thiebaud H., Blake G., Sembiring S. and Alary J., 1992. Mesocosms and microcosms utilization for ecotoxicity evaluation of dichloromethane, a chlorinated solvent. Chemosphere, 24 : 37-50

Merlin G., Vuillod M., Lissolo T. and Clément B., 2002. Fate and bioaccumulation of isoproturon in outdoor aquatic microcosms. Environmental Toxicology and Chemistry, 21 : 1236-1242

Meuling W.J.A., Ravensberg L.C., Roza L. and van Hemmen J.J., 2005. Dermal absorption of chlorpyriphos in human volunteers. International Archives of Occupational and Environmental Health, 78 : 44-50.

Mhadhbi L., Boumaiza M. and Beiras R., 2010. A standard ecotoxicological bioassay using early life stages of the marine fish *Psetta maxima*. Aquatic Living Resources, 23 : 209-216.

Mitchelmore C.L. and Rice C.P., 2006. Correlations of nonylphenol-ethoxylates and nonylphenol with biomarkers of reproductive function in carp (*Cyprinus carpio*) from the Cuyahoga river. Science of the Total Environment, 371 : 391-401.

Milam C.D., Farris J.L., Dwyer F.J. and Hardesty D.K., 2005. Acute toxicity of six freshwater mussel species (Glochidia) to six chemicals : implications for daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (Unionidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48 : 166-173.

Mohapatra P.K. and Mohanty R.C., 1990. Interaction of agrochemicals with cyanobacteria. In : Sastree N. (ed), Prospectives in aquatic ecotoxicology, Narendra Publishing House, New Delhi, 1-15.

Mohr S., Feibicke M., Berghahn R., Schmiediche R. and Schmidt R., 2008. Response of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to the herbicide metazachlor. Environmental Pollution, 152 : 530-542.

Monod G., Rime H., Bobe J. and Jalabert B., 2004. Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on *in vitro* oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Environmental Research, 58 : 143-146.

Moreno-Garrido L., Lubiăn L.M. and Soares A.M.V.M., 2000. Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. Ecotoxicology and Environmental Safety, 47 : 112-116.

Mowatt J.A., 1965. A survey of results on the occurrence of auxins and gibberellins in algae. Botanica Marina, 8 : 149-155.

Mullin J.B. and Riley J.P., 1955. The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. Analytica Chimica Acta, 12 : 162-176.

Muscarella D.E., Keown J.F. and Bloom S.E., 1984. Evaluation of the genotoxic and embryotoxic potential of chlorpyrifos and its metabolites *in vivo* and *in vitro*. Environmental Mutagenesis, 6 : 13-23.

-N-

Nandi S., Gupta P.S.P., Roy S.C., Selvaraju S. and Ravindra J.P., 2011. Chlorpyriphos and endosulfan affect Buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro* directly and through cumulus cells. Environmental Toxicology, 26 : 57-67.

Napolitano G.E., Ackman R.G. and Silva-Serra M.A., 1993. Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) fed on microalgae. Marine Biology, 117 : 647-654.

Nason M.A., Farar J. and Barlett D., 2007. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress. Pest Management Science, 63 : 1191-1200.

Naylor C.G., Mieure J.P., Adams W.J., Weeks J.A., Castaldi F.J., Ogle L.D. and Romano R.R., 1992. Alkylphenol ethoxylates in the environment. Journal of the American Oil Chemists' Society, 69 : 695-703.

Nice H.E., Thorndyke M.C., Morritt D., Steele S. and Crane M., 2000. Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. Marine Pollution Bulletin, 40 : 491-496.

Nice H.E., Moritt D., Crane M. and Thorndyke M., 2003. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption ? Marine Ecology Progress Series, 256 : 293-300.

Nørgaard K.B. and Cedergreen N., 2010. Pesticide cocktails can interact synergically on aquatic crustaceans. Environmental Science and Pollution Research, 17 : 957-967.

-O-

Oakes D.J. and Pollak J.K., 2000. The *in vitro* evaluation of the toxicities of three related herbicide formulations containing ester derivates of 2,4,5-T and 2,4-D using sub-mitochondrial particles. Toxicology, 151:1-9.

OECD, 1992. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2 : Effects on biotic systems Test N° 210 : Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. Paris, France : Organization for Economic Cooperation and Development.

OECD, 1998. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems Test N° 212 : Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. Paris, France : Organization for Economic Cooperation and Development.

Oestreich A., Schmid P. and Schlatter C., 1997. Biological monitoring of the fungicide epoxiconazol during application. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33 : 329-335.

Oleszczuk P., 2008, Heterocypris incongruens as a tool to estimate sewage sludge toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry, 27 : 864-872

Oruç E.O., 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochomis niloticus* exposed to chlorpyrifos. Pesticide Biochemistry and Physiology, 96 : 160-166.

-P-

Pablo F., Krassoi F.R., Jones P.R.F., Colville A.E., Hose G.C. and Lim R.P., 2008. Comparison of the fate and toxicity of chlorpyrifos. Laboratory versus a coastal mesocosm system. Ecotoxicology and Environmental Safety, 71 : 219-229.

Pagano G. and Trieff N.M.,1992. Use of echinoids in *in vitro* embryotoxicity and teratogenicity studies. Toxicology *In Vitro*, 6 : 177-178.

Papst M.H. and Boyer M.G., 1980. Effects of two organophosphorus insecticides on the chlorophyll a and pheopigment concentrations of standing ponds. Hydrobiologia, 69 : 245-250.

Parent-Raoult C., 2004. Etude en systèmes artificiels de laboratoire des effets de rejets urbains de temps de pluie sur les communautés périphytiques : influence de facteurs d'exposition. Thèse. ED : Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques. Spécialité : Ecosystèmes, Evolution, Modélisation, Microbiologie Lyon et Vaulx-en-Velin : Université Claude Bernard (UCBL), Lyon 1 et LSE-ENTPE, 297p.

Park C.J., Kang H.S. and Gye M.C., 2010. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,30-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia : Anura). Chemosphere, 81 : 1292-1300.

Partensky F., Gentien P. et Sournia A., 1991 a. *Gymnodinium* cf *nagasakiense* = *Gyrodinium* cf *aureolum* (Dinophycées). *In* : Le phytoplancton nuisible des côtes de France. IFREMER. CNRS : 63-82.

Partensky F. and Vaulot D., 1991 b. Growth and cell cycle of two closely related red tide forming dinoflagellates : *Gymnodinium nagasakiense et G. cf. nagasakiense*. Journal of Phycology, 27 (6) : 733-742.

Passeport E., Benoit P., Bergheaud V., Coquet Y. and Tournebize J., 2011. Epoxiconazole degradation from artificial wetland and forest buffer substrates under flooded conditions. Chemical Engineering Journal, 173 : 760-765.

Peck A.M. and Hornbuckle K.C., 2005. Gas-phase concentrations of current-use pesticides in Iowa. Environmental Science and Technology, 39 : 2952-2959.

Pehkonen S.O. and Zhang Q., 2002. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters : a critical review. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 32 : 17-72.

Pelte T., 1995. Effets de l'atrazine sur les peuplements du lac Léman. Etude expérimentale appliquée aux successions saisonnières du phytoplancton. Mémoire de fin d'étude d'Ingénieur des techniques agricoles. Enesead-INRA Thonon 51 p. + annexes.

Peng J., Place A.R., Yoshida W., Anklin C. and Hamann T., 2010. Structure and absolute configuration of karlotoxin-2, an ichthyotoxin from the marine dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. Journal of the American Chemical Society, 132 : 3277-3279.

Percival G.C. and Noviss K., 2008. Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). Tree Physiology, 28 : 1685-1692.

Péres J.M. et Picard J., 1956. Notes préliminaires sur les résultats de la campagne de recherches benthiques de la Calypso dans la Méditerranée Nord-Orientale. Rec. Trav. Sta. mar. Endoume., 11, (18) : 5-13.

Persoone G., Goyvaerts M., Janssen C., De Coen W. and Vangheluwe M., 1993. Cost-effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of toxkits. Final Report. Contract ACE 89/BE 2/D3. Commission of the European Communities. 142 p + Annexes 6p.

Pesticide Action Network (PAN) Africa, 2006. Projet Renforcement des Capacités des ONGs en Afrique en Appui au Programme Africain relatif aux Stocks de Pesticides obsolètes (PASP) DGF-O5, 50 p.

Philips Dales R., 1960. On the pigments of the Chrysophyceae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 39: 693-699.

Piorreck M. and Pohl P., 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids, fatty acids in green and blue-green algae during growth phase. Phytochemistry, 23 : 217-223.

Piretti M.V., Pagliuca G., Boni L., Pistocchi R., Diamante M. and Gazotti T., 1997. Investigation of 4-methyl sterols from cultured dinoflagellate algal strains. Journal of Phycology, 33 : 61-67.

Pojana G., Gomiero A., Jonkers N. and Marcomini A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. Environment International, 33 : 155-163.

Ponurovsky S.K. and Yakovlev Y.M., 1992. The reproductive biology of the japanese littleneck, *Tapes phillipinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) (Bivalvia : Veneridae). Journal of Shellfish Research, 11 : 265-277.

Porsbring T., Blanck H., Tjellström H., Backhaus T., 2009. Toxicity of the pharmaceutical clotrimazole to marine microalgal communities. Aquatic Toxicology , 91 : 203-211.

Powles S.B. and Holtum J.A.M. (eds)., 1994. Herbicide resistance in plants. Biology and Biochemistry, CRC Press, Boca Raton, Fl.

-Q-

Quiniou F. and Guillou. M., 1999. Arrest and delay in embryonic development in sea urchin populations of the bay of Brest (Brittany, France), link with environmental factors . Marine Pollution Bulletin, 38 (5) : 401-406.

Quiniou F., Gnassia-Barelli M., Geffard A., Mouneyrac C., His E. and Roméo M., 2007. Biochemical responses of oyster larvae in a field experiment. Environment International, 33 : 27-33.

Quiniou F., His E., Delesmont R. et Casey X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai "développement embryo-larvaire de bivalve". Ifremer (Ed), 22 p.

Quiniou F., Judas A. et Le squer-André E., 1997. Toxicité potentielle des eaux et des sédiments des principaux estuaires de la rade de Brest évaluée par deux bio-essais. Ann. Inst. Océanogr., 73 (1) : 35-48.

Quiniou L., 1986. Les peuplements de poissons démersaux de la pointe de la Bretagne : environnement, écologie, structure démographique, relations trophiques. Thèse de doctorat : sciences naturelles. 346 p.

Quinn B., Gagné F., Blaise C, Costello M.J, Wilson J.G. and Mothersill C., 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 142 : 118–127.

-R-

Rademacher W., 2000. Growth retardants : effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51 : 501-531.

Ramade F., 2002, Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Paris : Dunod. 1075p.

R-Biopharm France, 2006, Catalogue environnement 2006 : Tarif environnement 2006. 18p.

Rejeb-Jenhani A. et Romdhane M.S., 2002. Impact des perturbations anthropiques sur l'évolution du phytoplancton de la lagune de Boughrara, (Tunisie) (2002). Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô, 29 : 65-75.

Ricciardi F., Matozzo V. and Marin M.G., 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. Marine Pollution Bulletin, 57 : 365-372.

Rice C.P., Schmitz-Afonso I., Loyo-Rosales J.E., Link E., Thoma R., Fay L., Altfater D. and Camp M.J., 2003. Alkylphenol and alkylphenol-ethoxylates in carp, and sediment from the Cuyahoga river, Ohio. Environmental Science and Technology, 37 : 3747-3754.

Rier S. T. and Stevenson R. J., 2006, Response of periphytic algae to gradients in nitrogen and phosphorus in streamside mesocosms. Hydrobiologia, 561 : 131-147

Rioboo C., Gonzalez O., Herrero C. and Cid A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. Aquatic Toxicology, 59 : 225-235.

Riva C., Porte C., Binelli A. and Provini A., 2010. Evaluation of 4-nonylphenol *in vivo* exposure in *Dreissena polymorpha* : bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 152 : 175-181.

Robert R. et His E., 1985a. Croissance et spectre de tailles de six algues utilisées pour la nutrition de larves de bivalves en écloserie, en culture non renouvelée. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 49(3-4), 165-173. http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1778/

Robert R. and His E., 1985b. Combined effects of salinity and cadmium chloride upon embryos and larvae of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Marine Environmental Research, 15 : 303-312.

Robert R., Chretiennot-Dinet M., Kaas R., Martin-Jézéquel V., Moal J., Le Coz J.R., Nicolas J.L., Bernard E., Connan J.P., Le Dean L., Le Gourrierec G., Leroy B. et Quéré C., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en écloserie de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage. Rapport Ifremer, 145 p.

Romani G. and Beffagna N., 1991. Effect of some triazole fungicides on intracellular pH and on cell membrane permeability in leaves of *Elodea densa* (Planch.) Casp. New Phytologist, 117 : 431-437.

-S-

Sailerova E. and Zwiazek J.J., 1996. Early effects of triadimefon on water relations, sterol composition and plasma membrane ATPase in white spruce (*Picea glauca*). Physiologia Plantarum, 97 : 747-753.

Sandal S. and Yilmaz B., 2011. Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and non-smokers. Environmental Toxicology, 26 : 433-442.

Sanderson J.T., Boerma J., Lansbergen G.W. and van den Berg M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortcal carcinoma cells. Toxicology and Applied Pharmacology, 182 : 44-54.

San Martin, G.A., 1990. Suivi d'une opération de transplantation de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lmk) (Echinodermatea : echinidea) dans la région marseillaise. Contrat N°87 3430066 IFREMER/GIS Posidonie, Fr., 16p.

Sbrilli G., Calamati E., Boccalini S., Bimbi B. and Pistolesi F., 2003. Effects of nutrients and salinity on the algal assay using *Pseudokirshneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 71 : 609-616.

Sbrilli G., Bimbi B., Cioni F., Pagliai L., Luchi F. and Lanciotti E., 2005. Surface and ground waters characterization in Tuscany (Italy) by using algal bioassay and pesticide determinations : comparative evaluation of the results and hazard assessment of the pesticides impact on primary productivity. Chemosphere, 58 : 571-578.

Schöfl U.A. and Zinkernagel V., 1997. A test method based on microscopic assessments to determine curative and protectant fungicide properties against *Septoria tritici*. Plant Pathology, 46 : 545-556.

Sefrioui S. B. et Chergui H., 2002, Application de microbiotests en kits (Toxkits) dans la caractérisation de la toxicité des eaux usées de la ville de Fès (Maroc). Journal Européen d'Hydrologie, 33 (1) : 101-114

Seguin F., Leboulanger C., Rimet F., Druart J. C. and Bérard A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 40 : 198-208.

Seike N., Wanibuchi H., Morimura K., Wei M., Nishikawa T., Hirata K., Yoshikawa J. and Fukushiman S., 2003. Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. Cancer Lettters, 192 : 25-36.

Seki T., Satake M., Mackenzie L., Kaspar H.F. and Yasumoto T., 1995. Gymnodinine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. Tetrahedron Letters, 36 : 7093-7096.

Servos M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. Water Quality Research Journal of Canada, 34 : 123-177.

Shun-Xing L, Hua-Sheng H, Feng-Ying Z, Nan-Sheng D, Fang L., 2007. Influence of nitrate on metal sorption and bioaccumulation in marine phytoplankton, *Dunaliella salina*. Environmental Toxicology, 22 : 582-588.

Simon D., Holliwell S. and Robertson D., 1995. The impact of chlorpyrifos on an enclosure system in a shallow billabong. Australian Journal of Ecotoxicology, 1 : 137-142.

Soetaert A., Moens L.M., Van der Ven K., Van Leemput K., Naudts B., Blust R. and De Coen W.M., 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C., 142 : 66-76.

Soso A.B., Barcellos L.J.G., Ranzani-Paiva M.J., Kreutz L.C., Quevedo M.R., Anziliero D., Limna M., Bolognesi da Silva L., Ritter F., Bedin A.C. and Finco J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 23 : 308-313.

Soudant P., Le Coz J.R., Marty Y., Moal J., Robert R. and Samain J.F., 1998. Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, 119A : 451-457.

Spehar R.L., Brooke L.T.,Markee T.P. and Kahl M.D., 2010. Comparative toxicity and bioconcentration of nonylphenol in freshwater organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 29 : 2104-2111.

Srivastav M., Kishor A. and Sharma R.R., 2010. Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.). Scientia Horticulturae, 125 : 785-788.

Stachowski-Haberkorn S., Quiniou F., Nédélec M., Robert R., Limon G. and De le Broise D., 2008. *In-situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*). Ecotoxicology, 17 : 235-245.

Stachovski-Haberkorn S., Quiniou L., Beker B., Haberkorn H., Marie D. and de la Broise D., 2009. Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic assessment on phytoplancton communities. Ecotoxicology, 18 : 364-376.

Stebbing A.R.D., 1998a. A theory for growth hormesis. Mutation Research. 403 : 249–258.

Stebbing A.R.D., 1998b. Hormesis. the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Science of the Total Environment, 22 : 213-234.

Stefanidou M., Maravelias C. and Spiliopoulou C., 2009. Human exposure to endocrine disruptors and breast milk. Endocrine, metabolic & immune disorders. Drug targets, 9 : 269-276.

Strickland J.D.H. and Parsons T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin 167, Stevenson J.C. (Ed). The Alger Press. 310 p.

Sutter G., Ed., 1993. Ecological Risk Assessment. Boca Raton, Lewis Pubs. 538 pp.

-T-

Tabata A., Kashiwada S., Ohnishi Y., Ishikawa H., Miyamoto N., Itoh M. and Magara Y., 2001. Estrogenic influences of estradiol-17ß, *p*-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias lapites*) at detected environmental concentrations. Water Sci. Technol., 43 : 109-116.

Takano H., 1968. On the diatom *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) emend. and its dwarf form pumilus forma nov. Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 100 : 35-43.

Taub F. B., 1989. Standardized Aquatic Microcosm. Development and Testing. In: Boudou A., Rybeyre F., Aquatic Ecotoxicology: Fundamentals, Concepts and Methodologies. Boca Raton, Florida: CRC Press, Vol. 2. pp. 47-91.

Taxvig C., Hass U., Axelstad M., Dalgaard M., Boberg J., Andeasen H.R. and Vinggaard A.M. 2007. Endocrine-disrupting activities *in vivo* of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. Toxicological Sciences, 100 : 464-473.

TenEyck M.C. and Markee T.P., 2007. Toxicity of nonylphenol, monoethoxylate, and nonylphenol diethoxylate and mixtures of these compounds to *Pimephales promelas* (Fathead Minnow) and *Ceriodaphnia dubia*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 53 : 599-606.

TGD, 2003. Revised Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission

Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market : chapter 3B : environmental risk assessment. (http://ecb.jrc.it/).

Thain J.E., 1983. The acute toxicity of bis TBT oxide to the adults and larvae of some marine organisms. ICES.C.M., 1983/E:13, 4 p. International Council for Exploration of the Sea, Copenhagen.

Thain J.E., 1984. Effects of mercury on the prosobranch mollusc *Crepidula fornicata* : Acute lethal toxicity and effects on growth and reproduction of chronic exposure. Marine Environmental Research, 12 : 285-309.

Thain J.E., 1992. Use of the oyster *C. gigas* embryo bioassay on water and sediment elutriate samples from the German Bight. Marine Ecology Programming Series, 91 : 211-213.

Theriot C.M. and Grunden A.M., 2011. Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. Applied Microbiology of Biotechnology, 89 : 35-43.

Thrasher J.D., Madison R. and Broughton A., 1993. Immunologic abnormalities in human exposed to chlorpyrifos : preliminary observations. Archives of Environmental Health, 48 : 89-93.

Tomanek I., Diehl J.M. and Johnson S.E., 2010. Nonylphenol in marine organisms in North American estuaries : trophic chain accumulation and proteomic responses. Abstracts/ Comparative Biochemistry and Physiology. Part A 157 : S42-S48.

Tomlin C.D.S., 2000. The pesticide manual., 12th edn, British crop protection council. Farnham, Surrey, UK.

Tortonese E., 1965: Fauna d'Italia.Vol.VI Echinodermata. Calderini Publ., Bologna, Italia : 422p+I-XIII.

Tremolada P., Finizio A., Villa S., Gaggi C. and Vighi M., 2004. Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. Aquatic Toxicology, 67 : 87-103.

Triffault-Bouchet G., 2004, Effets sur les écosystèmes aquatiques lentiques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets - Application à des mâchefers d'UIOM et à des boues de dragage de canaux. Thèse. Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées. Chambéry, Vaux en Velin: Université de Savoie et LSE de l'ENTPE, 309p.

Tripathi G. and Shasmal J., 2011. Concentration related responses of chlorpyriphos in antioxidant, anaerobic and protein synthesizing machinery of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 99 : 215-220.

Tuckey D.M., Orcutt D.M. and Hipkins P.L.L., 2002. Inherent and growth stage-related differences in growth and lipid and sterol composition of algal species sensitive and tolerant to sterol-inhibiting fungicides. Environmental Toxicology and Chemistry, 21 : 1715-1723.

Turbak S.C., Olson S.B. and McFetters G.A., 1986. Comparison of algal assay systems for detecting waterborn herbicides and metals. Water Research, 20 : 91-96.

-V-

Vallini G., Frassinetti S., D'Andrea F., Catelani G. and Agnolucci M., 2001. Biodegradation of 4-(1-nonyl)phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquaetextoris* : identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. International Biodeterioration & Biodegradation, 47 : 133-144.

Van den Brink P.J., van Donk E., Gylstra R., Crum S. and Brock T.M., 1995. Effects of chronic low concentrations of chlorpyrifos and atrazine in indoor freshwater microcosms. Chemosphere, 3181-3200.

Van den Brink P.J., Van Wijngaarden R.P.A., Lucassen G.W.H., Brock T.C.M. and Leeuwangh P., 1996. Effects of the insecticide Dursban® 4E (ai chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches : II. Community responses and recovery. Environmental Toxicology & Chemistry, 15 : 1143-1153.

Van den Brink P.J., Hartgers E.M., Gylstra R., Bransen F. and Brock T.C.M. 2002. Effects of two insecticides in freshwater microcosms : II. Responses of plankton and ecological risk assessment. Ecotoxicology, 11 : 181-197.

Van den Brink P.J., Crum S.J.H., Gylstra R., Bransen F., Cuppen J.G.M. and Brock T.C.M., 2009. Effects of a herbicide-insecticide mixture in freshwater microcosms : risk assessment and ecological effect chain. Environmental Pollution, 157 : 237-249.

Van Ry D.A., Dachs J., Gigliotti C.L., Brunciak P.A., Nelson E.D. and Eisenrich S.J., 2000. Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the lower Hudson River estuary. Environmental Science and Technology, 34 : 2410-2417.

Van Wagoner R.M., Deeds J.R., Tatters A.O., Place A.R., Tomas C.R. and Wright J.L.C. 2010. Structure and relative potency of several karlotoxins from *Karlodinium veneficum*. Journal of Natural Products, 73 : 1360-1365.

Van Wijngaarden R.P.A., Van den Brink P.J., Crum S.J.H., Voshaar J.H.O., Brock T.C.M. and Leeuvangh P., 1996. Effects of the insecticide Dursban® (active ingredient chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches : I. Comparison of short-term toxicity between the laboratory and the field. Environmental Toxicology and Chemistry, 15 : 1133-1142.

Van Wijngaarden R.P.A., Brock T.C.M. and Douglas M.T., 2005. Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems : the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds. Pest Management Science, 61 : 923-935.

Verlaque, 1984. Biologie des juvéniles de l'oursin herbivore Paracentrotus lividus (Lamarck): sélectivité du broutage et impact de l'espèce sur les communautés algales de substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France). Botanica Marina, 27 (9) : 401-424.

Verma R.S., Mehta A. and Srivastava N., 2007. *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress : attenuation by antioxidant vitamins. Pesticide Biochemistry and Physiology, 191-196.

Véron B., Billard C., Dauguet J.C. and Hartmann M.A., 1996. Sterol composition of *Phaeodactylum tricornutum* influenced by growth temperature and light spectral quality. Lipids, 31 : 989-994.

Vindimian E., Robaut C. and Fillion G., 1983. A method for cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. J. Appl. Biochem. 5 : 261-268.

Vivacqua A., Recchia A.G., Fasanella G., Gabriele S., Carpino A., Rago V., Di Gioia M.L., Leggio A., Bonofiglio D., Liguori A. and Maggiolini M., 2003. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor α in MCF7 breast cancer cells. Endocrine, 22 : 275-284.

Volatier L., 2004. Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe : études en bio-essais et canaux artificiels. Thèse. Spécialité : Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne et Vaux-en-Velin: INSA de Lyon et LSE-ENTPE, 303p.

-W-

Walker S., Bell K., Robinson G. and Widderick M., 2011. Flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis*) populations have developped glyphosate resistance in north-east Australian cropping fields. Crop Protection, 30 : 311-317.

Weiner R., Walch M., Labare M.P., Bonar D.B. and Colwell R.R., 1989. Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* (LST) on set of the oysters

Crassostrea gigas (Thunberg, 1973) and *C. virginica* (Gmelin, 1971). J. Shellfish Research, 8 :117-123.

Wellburn A.R., 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, 144 : 307-313.

Wessel N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F., Akcha F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17_-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. Aquatic Toxicology, 85: 133–142.

Wikfors G.H., Twarog J.W. Jr, Ferris G.E., Smith B.C. and Ukeles R., 1994. Survival and growth of post-set oysters and clams on diets of cadmium-contaminated microalgal cultures. Marine Environmental Research, 37 : 257-281.

Woelke C.E., 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Washington Department of Fisheries Technical Report, 9 : 1-93.

Wood E.D., Armstrong F.A. and Richards F.A., 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium copper reduction to nitrite. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom, 47 : 23-31.

Woods M., Kumar A. and Correll R., 2002. Acute toxicity of mixtures of chlorpyrifos, profenofos, and endosulfan to *Ceriodaphnia dubia*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68 : 801-808.

Wu Y.X. and von Tiedemann A., 2001. Physiological effects of azoxystrobin and epoxiconazole on senescence and the oxidative status of wheat. Pesticide Biochemistry and Physiology, 71 : 1-10.

Wu Y.X. and von Tiedemann A., 2002. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L .) exposed to ozone. Environmental Pollution, 116 : 37-47.

Wu Y., Lin C. and Yuan L., 2007. Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. Ecological Indicator, 7 : 768-775.

-Y-

Yang X., Yin D., Sun H., Wang X., Dai L., Chen Y. and Cao M., 1999. Distribution and bioavailability of rare earth elements in aquatic microcosm. Chemosphere, 39 : 2443-2450

Yao Y., Harner T., Blanchard P., Tuduri L., Waite D., Poissant L., Murphy C., Belzer W., Aulagnier F. and Sverko E., 2008. Pesticides in the atmosphere across canadian agricultural regions. Environmental Science and Technology, 42 : 5931-5937.

Ying G.G., Williams B. and Kookana R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. A review. Environment International, 28 : 215-226.

-Z-

Zhang L., Gibble R. and Baer K.N., 2003. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 55 : 330-337.

Zhou Q., Sun X., Gao R., Zhang Q. and Wang W., 2010. Mechanism study on OH-initiated atmospheric degradation of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos. Journal of Molecular Structure : THEOCHEM. 952 : 8-15.

Liste des abréviations

µ	taux de croissance
Iµi	taux d'inhibition
2,4-D	acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
2,4,5-T	acide 2,4,5-Trichlorophénoxyacétique
ADN	acide désoxyribonucléique
AERMC	Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse
AFNOR	Association française de normalisation
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APEs	Alkylphénol éthoxylates
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
CAS	Chemical Abstract Service
CE	Communauté Européenne
CSEO	Concentration Sans Effet Observé : concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observé. Dans ce travail elle correspond à la concentration Effective 10 % calculée.
CE_{10}	Concentration Effective 10 %. Concentration en contaminant qui induit un effet toxique (néfaste) donné chez 10 % des organismes exposés (pour une espèce donnée) après un temps d'exposition normalisé
CE_{50}	Concentration Effective 50 %. Concentration en contaminant qui cause un effet toxique (néfaste) donné chez 50 % des individus exposés (pour une espèce donnée) après un temps d'exposition normalisé.
CEP	Complexes Enzymatiques Photosynthétiques

CL_{50} Concentration Létale 50 %. Concentration en contaminant qui induit la mort chez 50 % des individus exposés.

CL_{10} Concentration Létale 10 %. Concentration en contaminant qui induit la mort chez 10 % des individus exposés.

CSEO Concentration sans effet observé (NOEC en anglais No Observed Effect Concentration)

DGEDA Direction Générale des Etudes et du Développement Agricole

DGPA Direction Générale des Pêches et d'Aquaculture

EFSA European Food Safety Authority

EPA Environmental Protection Agency

Epoxi Epoxiconazole

ES Erreur Standard

f/2 Milieu de culture selon Guillard et Ryther, 1962

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations

G+ Milieu de culture correspond à un enrichissement maximal de l'eau de mer en sels nutritifs dans le golfe de Gabès à la fin de l'automne et au début de l'hiver

HC-SC Health Canada. Santé Canada

HPLC Chromatographie en phase liquide à haute performance

IC Intervalle de confiance

ICC indice de contamination chimique

INERIS Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

IFEN Institut Français de l'Environnement

IFREMER Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INS Institut National des Statistiques

INSTM Institut National des Sciences et Technologies de la Mer

ISO International Organization for Standardization

JRC Joint Research Centre

LED Light-emitting diode

MCPA acide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetique

NOEC No Observed Concentration Effect (Concentration sans effet observé). Concentration mesurée suite à des essais de toxicité chronique et pour laquelle aucun effet n'est observé

NP Nonylphénol

NPEs Nonylphénol éthoxylates

NT Norme Tunisienne

OCDE Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OP Opus (formulation de l'époxiconazole)

PAN Pesticide Action Network

PAR Radiations Photosynthétiquement Actives

POC Pesticides organochlorés

SAPS Systèmes Aquatiques Photosynthétiques Stabilisés

TBT Tri Buthyl Tin = Tributylétain

T-iso clone *Isochrysis affinis galbana*

Table des illustrations

FIGURES

Figure 1 : Evolution des importations de pesticides en Tunisie entre 1999 et 2006 (source Pan Africa, 2006) 17
Figure 2 : Processus de transfert des pesticides vers les différents compartiments de l'environnement (selon L'hermite et al., 2008 modifié). 21
Figure 3: Structure chimique du nonylphénol 37
Figure 4 : Structure chimique de l'epoxiconazole 37
Figure 5 : Structure chimique du chlorpyriphos-éthyl 38
Figure 6 : Photographie au microscope de Chaetoceros calcitrans. 39
Figure 7 : Photographie au microscope électronique 40
Figure 8 : Photographie au microscope optique de Tetraselmis suecica. 41
Figure 9 : Variations mensuelles des concentrations en sels nutritifs dans le golfe de Gabès 42
Figure 10 : Emplacement du prélèvement (Lagune de Boughrara, golfe de Gabès, Tunisie) (Source Google Earth 2010) 49
Figure 11 : Photographie au microscope de Karenia selliformis. 50
Figure 12 : Paracentrotus 54
Figure 13 : Crassostrea gigas (mer-littoral.org) 57
Figure 14 : Types d'anomalies du développement embryo-larvaire chez l'huître creuse C. gigas (Quiniou et al., 2005). 59
Figure 15 : Ruditapes philippinarum 60
Figure 16 : Cycle de développement de la palourde japonaise Ruditapes philippinarum (selon Fabioux, 2004 - modifié). 61
Figure 17 : Psetta maxima 64
Figure 18 A, B : Effet de l'époxiconazole (Opus), ajouté à différentes concentrations dans le milieu de culture, sur la croissance de C. calcitrans, cultivée en lumière continue. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. A) milieu f/2 ; B) milieu G+. 71
Figure 19 A, B : Influence de l'époxiconazole (Opus), présent à différentes concentrations dans le milieu de culture, sur la croissance de C. calcitrans, cultivée en lumière alternée. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. A) milieu f/2 ; B) milieu G+. 72
Figure 20: Teneur en pigments de C. calcitrans cultivée en milieu f/2 et lumière continue en présence de 1,4 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en

ng/million de cellules ± ES. L'astérisque désigne une différence significative par rapport à t0 au seuil de 5 %. 74

Figure 21 A, B, C : Influence de l'époxiconazole (1,4 µg/L) (Opus) sur la teneur en pigments de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière continue. A) chlorophylle a ; B) chlorophylle c et C) caroténoïdes. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à T0 et au témoin..... 75

Figure 22 A, B, C : Influence au cours du temps de l'époxiconazole (1,4 µg/L) (Opus) sur la teneur en pigments de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière alternée. A) chlorophylle a ; B) chlorophylle c et C) caroténoïdes. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à T0 et au témoin. 76

Figure 23 A, B : Influence au cours du temps de l'époxiconazole (Opus) sur la teneur en ATP de C. calcitrans cultivée en lumière continue : A) milieu f/2 ; B) milieu G+. Résultats exprimés en pmoles/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin..... 77

Figure 24 A, B : Evolution au cours du temps de la teneur en ATP de C. calcitrans, cultivée en lumière alternée en présence d'époxiconazole (Opus). A) milieu f/2 ; B) milieu G+. Résultats exprimés en pmoles/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin. 78

Figure 25 : Volume cellulaire de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière continue en présence de 2,88 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en µm3 ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin..... 83

Figure 26 : Effet au cours du temps de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), ajouté à différents stades physiologiques (à 0, 1, 2 ou 3 jours), sur la croissance de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin. 84

Figure 27 : Effet au cours du temps de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), ajouté à différents stades physiologiques (à 0, 1, 2 ou 3 jours), sur la croissance de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière alternée. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin. 85

Figure 28 A, B : Effet au cours du temps de 2,16 µg/l d'époxiconazole (Opus) ajouté à différents stades physiologiques sur les échanges gazeux : photosynthèse (A) et respiration (B) chez C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue. Vitesses exprimées en µLO2/h/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin..... 86

Figure 29: Effet de l'addition de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), à différents moments de la culture, sur l'évolution au cours du temps de la teneur en ATP de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue. Résultats exprimés en picomoles/million de cellules ± ES. L'astérisque désigne une différence significative par rapport au témoin au seuil de 5 %. 88

Figure 30 A, B : Effet au cours du temps du nonylphénol (NP, µg/L), ajouté à différentes concentrations dans le milieu de culture, sur la croissance de C. calcitrans, cultivée en lumière continue. Résultats exprimés en millions de cellules /L ± ES. A) milieu f/2 ; B) milieu G+. 90

Figure 31 A, B, C : Evolution au cours du temps de la teneur en pigments de C. calcitrans, cultivée en milieu G+, lumière continue, en présence de 20 µg/L de nonylphénol (NP). Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES. A) chlorophylle a ; B) chlorophylle c ; C) caroténoïdes. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin et à T0. 91

Figure 32 : Evolution en fonction de la durée de culture, de la teneur en ATP de C. calcitrans cultivée en milieu G+, en lumière continue, en présence ou non de nonylphénol (NP). Résultats exprimés en pmoles/million de cellules ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin et à T0. 92

Figure 33: Volume cellulaire de C. calcitrans cultivée en milieu G+ et en lumière continue, en présence ou non de 20 µg/L de nonylphénol. Résultats exprimés en µm3 ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin et à T0. 97

Figure 34 : Composition taxonomique et abondance des principales espèces au sein de la population phytoplanctonique, dans les microcosmes au début et au 6ème jour de l'expérience. 109

Figure 35 : Composition taxonomique et abondance des principales espèces parmi les populations phytoplanctoniques présentes dans les microcosmes au début et à la fin de l'expérience. 111

Figure 36 : Effet du chlorpyriphos-éthyl (Dursban) (A) et du nonylphénol (B) sur l'évolution au cours du temps de la teneur en chlorophylle a dans les microcosmes. Résultats exprimés en µg/L ± ES. 113

Figure 37 A, B : Effet de l'époxiconazole (Opus) testé seul (A) ou en mélange avec le chlorpyriphos-éthyl (Dursban) (B) sur l'évolution au cours du temps de la teneur en chlorophylle a dans les microcosmes. Résultats exprimés en µg/L ± ES. 113

Figure 38 A, B, C, D : Cinétique de l'évolution des teneurs totales en azote total (NT) et en phosphores (PT) en présence des différents contaminants ajoutés dans les microcosmes. A) chlorpyriphos-éthyl (Dursban) ; B) nonylphénol ; C) époxiconazole (Opus) ; D) chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole. Résultats exprimés en µmol/L ± ES. 114

Figure 39 A, B, C, D : Cinétique de l'évolution de la teneur en acide silicique (SiOH4) en présence des différents contaminants ajoutés dans les microcosmes. A) chlorpyriphos-éthyl (Dursban); B) nonylphénol; C) époxiconazole (Opus) ; D) chlorpyriphos-éthyl + époxiconazole. Résultats exprimés en µmol/L ± ES. 115

Figure 40 : Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence du chlorpyriphos-éthyl (Dursban). Résultats exprimés en milliers de cellules/L. 116

Figure 41 : Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en milliers de cellules/L. 117

Figure 42 : Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence de nonylphénol. Résultats exprimés en millers de cellules/L.....118
Figure 43 : Evolution de la population de K. selliformis dans les microcosmes en présence du mélange : 0,5µg/L de chlorpyriphos-éthyl (Dursban) + 0,036 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en milliers de cellules/L. 119
Figure 44 : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence de chlorpyriphos-éthyl (Dursban). Résultats exprimés cellules/L.....120
Figure 45 : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en cellules/L. 120
Figure 46 : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence de nonylphénol. Résultats exprimés en cellules/L.....121
Figure 47 : Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du mélange : 0,5 µg/L de chlorpyriphos éthyl (dursban) et 0,036 µg/L d'époxiconazole (Opus). Résultats exprimés en cellules/L.....122
Figure 48 : Effet de la concentration en époxiconazole de l'Opus (moyenne ± IC 95 %), appliqué dès fécondation pendant 24 h, sur le taux des différentes anomalies de C. gigas : du manteau et de la coquille (M+C), de l 'embryon (E). Larves normales (N). 129
Figure 49 : Effet de la concentration en nonylphénol (moyenne ± IC 95 %), appliqué dès fécondation pendant 24 h, sur le taux des différentes anomalies de C. gigas : du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E) ; Larves normales (N).....130
Figure 50 : Effet de la concentration en ion cuivre (moyenne ± IC 95 %), appliqué dès fécondation pendant 24 h, sur le taux des différentes anomalies de C. gigas : anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).....130
Figure 51 : Taux des différentes anomalies de R. philippinarum en fonction de la concentration en époxiconazole appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).....132
Figure 52 : Taux des différentes anomalies de R. philippinarum en fonction de la concentration en époxiconazole de l'Opus appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).....133
Figure 53 : Taux des différentes anomalies de la palourde en fonction de la concentration en nonylphénol appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).....133
Figure 54 : Taux des différentes anomalies de R. philippinarum en fonction de la concentration en ion cuivre appliqué dès fécondation pendant 48 h (moyenne ± IC 95 %). Anomalies du manteau et de la coquille (M+C), de l'embryon (E). Larves normales (N).....134
Figure 55 : Effet de la concentration en époxiconazole sur la métamorphose des larves de palourde, évalué après 48 h d'incubation. Résultats exprimés en pourcentages

bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes. 136
Figure 56 : Effet de la concentration en époxiconazole de l'Opus sur la métamorphose des larves de palourde, évalué après 48 h d'incubation. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.....137
Figure 57 : Effet de la concentration en nonylphénol sur la métamorphose des larves de palourde. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.....138
Figure 58 : Effet de la concentration en cuivre sur la métamorphose des larves de palourde. Résultats exprimés en pourcentages bruts de : post-larves, larves n'ayant pas achevé leur métamorphose (Métamorph. incomp.), larves non métamorphosées et larves mortes.....139
Figure 59 : Effet au cours du temps de l'époxiconazole, ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES. 142
Figure 60 : Effet au cours du temps de l'époxiconazole (Opus), ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES. 143
Figure 61 : Effet au cours du temps du nonylphénol, ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES.....144
Figure 62 : Effet au cours du temps du cuivre (µg/L), ajouté à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur la croissance du naissain de palourde. Résultats exprimés en µm ± ES.....145
Figure 63 : Influence des quatre contaminants, ajoutés à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur les densités de l'algue I. aff. galbana non consommée par le naissain de palourde après 48 h de traitement. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. 146
Figure 64 : Effet du cuivre (A), de l'Opus (B), du nonylphénol (C) et de l'époxiconazole (D), ajoutés à différentes concentrations dans l'eau de mer des microcosmes, sur le pourcentage d'algues T-iso consommées par le naissain de palourde après 48 h d'exposition. Résultats exprimés en % par rapport au témoin ± ES. Densité d'algues initiale : 40 000 cellules/L. * désigne une différence significative au seuil de 5 % des densités cellulaires de T-iso par rapport aux témoins. 147
Figure 65 : Effet des contaminants, testés en action indirecte via la contamination de T-iso, sur la croissance des larves de palourde, mesurée après 12 j d'exposition. Résultats exprimés en µm ± ES. Nonylphénol : 1,5 (NP 1,5) et 15 µg/L (NP 15) ; Opus : 5,16 (OP 5,16) et 51,6 µg/L(OP 51,6) ; Mélange : Opus (5,16 µg/L) + Nonylphénol (1,5 µg/L). * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à T0. 149

Figure 66 : Effet de l'époxiconazole (Opus) : 5,16 et 51,6 µg/L, testé en action indirecte, via une alimentation par l'algue T-iso contaminée, sur la densité d'algues non consommées par le naissain de palourde au cours du temps. Densité de T-iso initiale : 40 000 cellules/L. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport à témoin. 150

Figure 67 : Effet du nonylphénol (1,5 et 15 µg/L), testé en action indirecte, via une alimentation par l'algue T-iso contaminée, sur la densité d'algues non consommées par le naissain de palourde au cours du temps. Densité de T-iso initiale : 40 000 cellules/L. . Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin. 151

Figure 68 : Effet du mélange : Opus (5,16 µg/L) + Nonylphénol (1,5 µg/L), testé en action indirecte, via une alimentation par l'algue T-iso contaminée, sur la densité d'algues non consommées par le naissain de palourde au cours du temps. Densité de T-iso initiale : 40 000 cellules/L. Résultats exprimés en nombre de cellules de T-iso non consommées/L ± ES. * désigne une différence significative au seuil de 5 % par rapport au témoin.....152

TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre de substances actives et formulations commerciales pour chaque type de pesticide importé en Tunisie (Rapport Pan Africa 2006) 16
Tableau 2 : Exemples d'organismes tests utilisés en milieu aquatique pour la caractérisation des effets écotoxicologiques (liste non exaustive) (Angerville, 2009) 24
Tableau 3 : Exemples de microcosmes et de mésocosmes utilisés en milieu aquatique (Angerville, 2009). 26
Tableau 4 : Composition des milieux de culture. 43
Tableau 5 : Récapitulatif des différents bio-essais réalisés et des contaminants étudiés (substances actives et formulations). 67
Tableau 6 : CSEO et CE50 de l'époxiconazole (molécule pure) mesurées après trois jours de culture des trois algues dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue. Résultats exprimés en mg d'époxiconazole/L ± ES. 69
Tableau 7 : CSEO et CE50 de l'époxiconazole (Opus) mesurées après 3 jours de culture des trois algues dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue. Résultats exprimés en µg d'époxiconazole /L ± ES. 70
Tableau 8 : Taux de croissance (µ) de C. calcitrans mesuré après trois jours de culture dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue ou alternée. Résultats exprimés en µ/h ± ES. 72
Tableau 9 : CE50 de l'époxiconazole (Opus) mesurée après 3 jours de culture de C. calcitrans dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue et alternée. Résultats exprimés en µg/L d'époxiconazole ± ES. 73
Tableau 10 : Action aiguë de l'époxiconazole (Opus) sur la vitesse de respiration et de photosynthèse, en fonction de l'âge de la culture de C. calcitrans (milieu f/2 ; lumière continue). Vitesses mesurées après 1 h d'action, exprimées en µLO2/h/million de cellules ± E S. Entre parenthèses : % par apport au témoin. 79
Tableau 11 : Influence de l'époxiconazole (Opus), présent à différent concentrations dans le milieu de culture, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de C. calcitrans mesurée après 2, 3 et 4 jours de culture en milieu G+ et lumière continue. Vitesses exprimées en µLO2/h/million de cellules ± E S et en % par rapport au témoin. 80
Tableau 12 : Influence de l'époxiconazole (Opus), présent à différentes concentrations dans le milieu de culture sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de C. calcitrans, mesurée après 2, 3 et 4 jours de culture en milieu f/2 et lumière continue. Vitesses exprimées en µLO2/h/million de cellules ± E S. Entre parenthèses : % par apport au témoin. 81

Tableau 13 : Influence de l'époxiconazole (2 mg/L), présent dans le milieu de culture, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de C. calcitrans mesurée après 3 jours de culture en milieu f/2 et lumière continue. Vitesses exprimées en µLO2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin..... 82
Tableau 14 : Effet de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus) sur la teneur en pigments de C. calcitrans, mesurée après 3 jours de culture en milieu G+, en lumière continue. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES et en % par rapport aux témoins. 87
Tableau 15 : Effet de l'addition de 2,16 µg/L d'époxiconazole (Opus), à différents moments de la culture, sur la teneur en pigments de C. calcitrans mesurée après 4 jours de culture en milieu G+, en lumière alternée. Résultats exprimés en ng/million de cellules et en % par rapport aux témoins. 87
Tableau 16 : Effet du nonylphénol sur la croissance de trois algues phytoplanctoniques, mesurée après 3 jours de culture dans les milieux f/2 et G+, en lumière continue. Valeurs de CSEO et de CE50 exprimées en µg de nonylphénol/L ± ES. 89
Tableau 17 : Action aiguë du nonylphénol sur la respiration et la photosynthèse en fonction de l'âge de la culture (millions de cellules/L) de C. calcitrans (milieu f/2 ; lumière continue). Vitesses mesurées après 1 h d'action, exprimées en µLO2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin..... 93
Tableau 18 : Influence du nonylphénol, présent à différentes concentrations dans le milieu de culture G+, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de C. calcitrans mesurée après 2, 3, 4, 5 et 6 jours de culture, en lumière continue. Vitesses exprimées en µLO2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin..... 95
Tableau 19 : Influence du nonylphénol, présent à différentes concentrations dans le milieu de culture f/2, sur la vitesse de photosynthèse et de respiration de C. calcitrans. Vitesses exprimées en µLO2/h/million de cellules ± ES et en % par rapport au témoin, en fonction de l'âge de la culture (jours). 96
Tableau 20 : Valeurs des CSEO et CE50 pour quatre contaminants sur la taille des plutei. Mesures après 48 h d'exposition des œufs à l'époxiconazole, l'Opus, le nonylphénol ou au cuivre. Résultats exprimés en µg/L ± ES. 127
Tableau 21 : Valeurs des CSEO et CE50 mesurées après 24 h d'exposition aux trois contaminants, sur le développement embryo-larvaire. Résultats exprimés en µg/L ± ES 128
Tableau 22 : Valeurs des CSEO et CE50 mesurées après 48 h d'exposition des œufs de palourde aux quatre contaminants étudiés. Résultats exprimés en µg/L ± ES. 131
Tableau 23 : Valeurs des CSEO et CE50 mesurées après 48 h d'exposition aux quatre contaminants étudiés des larves de palourde au stade de la métamorphose. Résultats exprimés en µg/L ± ES. 135
Tableau 24 : Valeurs des CSEO et CE50 mesurées après 13 j d'exposition du naissain de palourde aux quatre contaminants étudiés. Résultats exprimés en µg/L ± ES. 140

Tableau 25 : Valeurs des CSEO et CE50 pour quatre contaminants, concernant l'éclosion des œufs du turbot. Mesures après 48 h d'exposition à l'époxiconazole, l'Opus, le nonylphénol ou au cuivre. Résultats exprimés en µg/L ± ES.....140
Tableau 26 : Valeurs des CL10 et CL50 pour quatre contaminants, concernant la survie des larves du turbot. Mesures après 6 j d'exposition à l'époxiconazole, l'Opus, le nonylphénol ou au cuivre. Résultats exprimés en µg/L ± ES.....141

Valorisation scientifique

Articles

Hourmant A., Amara A., Pouline P., Durand G., Arzul G. and Quiniou F, 2009. Effect of bentazon on growth and physiological responses of marine diatom: *Chaetoceros gracilis*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19 :109-115.

Amara A., Birhart C., Quiniou F., Durand G., El Bour M., Boudabous A., Hourmant A., Toxicity of epoxiconazole to the marine diatom *Chaetoceros calcitrans* : influence of growth conditions and algal development stage. Article soumis pour publication au JMBA.

Communications orales

2010 – Amara A., Hourmant A., Quiniou F., El Bour M. And Boudabbou A., Effet du bichromate de potassium sur la croissance et le métabolisme des algues marines *C. calcitrans, T. suecica, I. aff. galbana*. Article accepté pour communication au *39ème congrès international de la CIESM* , Venise (Italie), 10-14 Mai 2010.

2008 – Amara A., Quiniou F., Elbour M., Arzul G., Durand G., Boudabous A., Hourmant A., Etude de la toxicité du fongicide époxiconazole (formulation) sur les premiers niveaux trophiques marins : effets sur trois algues phytoplanctoniques (C. calcitrans, T. suecica, I. aff. galbana) et sur les larves d'huitres creuses (C. gigas). Communication orale avec acte présentée au *congrès de l'Association Tunisienne des Sciences de la Mer* ; Sousse, 20-23 décembre 2008.

Communications par affiches

2009 – Amara A., Birhart C., Hourmant A., Quiniou F., Durand G., EL Bour M., Boudabous A., Influence of the development stage of the marine diatom: *Chaetoceros calcitrans* in

the presence to the fungicide Epoxiconazole toxicity. Communication par affiche au *14ème édition de l'ISTA «International Symposium on Toxicity Assessment* », Metz, 30 août au 4 septembre 2009.

2009 – Amara A., Davy R., Quiniou F., Hourmant A., Durand G. , Chababi N., Boudabous A., Action de l'adjuvant nonylphénol sur trois algues phytoplanctoniques (*C. calcitrans, T. suecica, I. aff. galbana*) et sur les larves d'huîtres creuses (Crassostrea gigas). Communication par affiche dans le *39ème congrès du Groupe Français des Pesticides* ; Toulouse, 13-15 mai 2009.

2008 – Amara A., Sintes C., Hourmant A., Quiniou F., Arzul G., Durand G., Effets comparés de six pesticides sur la diatomée *Chaetoceros gracilis* : croissance, ATP et pigments. Communication par affiche dans le *38ème congrès du Groupe Français des Pesticides* ; Brest, 21-23 mai 2008.

2008 – Amara A., Hourmant A., Quiniou F., Arzul G., Durand G., Sensibilité de trois algues phytoplantoniques (*C. calcitrans, T. suecica, I. aff. galbana*) à la toxicité de l'époxiconazole et du bichromate de potassium. Communication par affiche dans le 38ème *congrès du Groupe Français des Pesticides* ; Brest, 21-23 mai 2008.

2006 - Amara A., Hourmant A., Stachowski S., Arzul G., Quiniou F., Durand G., Action d'un herbicide, le bentazone (formulation), sur la croissance et le métabolisme d'une diatomée marine : *Chaetoceros gracilis*. Communication par affiche dans le 31ème congrès de l'*Union des Océanographes de France* ; Nantes, 2-3 novembre 2006

2006 - Stachowski S., Amara A., Colmagro E., Pothier J., Hourmant A., Arzul G., Effects of pesticides on cellular ATP concentration in marine phytoplankton. Communication par affiche dans le *22nd European forum of young oceanographers*; UOF Caen, 9-12 Mai 2006.

2006 - Stachowski S., Amara A., Colmagro E., Pothier J., Hourmant A., Arzul G., Effects of pesticides on cellular ATP concentration in marine phytoplankton. Poster présenté aux *conférences internationales de l'EMECS* (Environmental Management of Encloses Coastal Seas, japon), Caen, 9-12 Mai 2006.

ABSTRACT

This work aims to study the effects of a few pesticides and one adjuvant on marine organisms, representatives of four trophic levels : micro-algae, echinoderm, bivalves and fish. Analysis of the pollu-sensitivity was based on the utilisation of existing bio-assays or adapted to this study.

Phytotoxic assessments were conducted on three phytoplanktonic species (*Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis aff. Galbana* et *Tetraselmis suecica*) using the fungicide epoxiconazole and the adjuvant nonylphenol. Sensitivity to these toxicants of *C. calcitrans* and *I. aff. Galbana* was high. Thus, when *C. calcitrans* was grown in a medium simulating pre-winter conditions in Gabès Gulf, EC_{50} values were respectively, 2.31 mg/L and 2.9 µg/L for epoxiconazole active ingredient and epoxiconazole-formulated. These results questioned the use of ecotoxicological data obtained solely using active molecules of pesticides rather the complete formulation and show that non-target micro-algae may be affected by a triazole fungicide.

Moreover, cell age, light and nutrient composition induced changes in epoxiconazole sensitivity, suggesting that cellular density is an important parameter in toxicity tests.

Analysis of a few physiological parameters show that contaminants used in this study induce an increase of pigment content, ATP synthesis, and rates of oxygen exchanges while the cell volume enlarges. Consequently, the toxicants might reduce the growth rate, by a prolongation of the cell cycle without affecting the production of new material for the construction of new cells.

Bioassays were conducted using microcosms during a bloom of the toxic algae *Karenia selliformis* in the Gulf of Gabès. The different toxicants (epoxiconazole, chlorpyrifos-éthyl, nonyphenol) produced drastic changes in the phytoplankton communities, depending on the type and concentration of the contaminant.

Phytotoxic assessments were conducted on marine animal models, using different developmental stages: embryo-larval development (sea urchin, oyster, and clam), metamorphosis larvae (clam) and larvae survival (turbot). Results show that turbot larvae are most sensitive to the action of contaminants with EC_{50} values ranging from 2.78 to 492 µg/L depending on the toxic and that the metamorphosis is the stage the most sensitive of the three stages of development of clam studied.

The pollutants produced developmental and embryonic abnormalities that might induce a reduction in the natural production by acting i) directly on the development of the marine organisms and ii) indirectly on the quality and bioavailability of food through the variation of phytoplankton biomass.

These results underline the need to study pollutant effects on marine organisms having different organizations to evaluate their full impact.

Keywords : pesticides, phytoplankton, echinoderm, bivalves, fish, physiological parameters, natural communities, higher trophic levels, development stage, bio-assay, microcosms, Gulf of Gabès.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail de thèse vise à analyser les effets de quelques pesticides et d'un adjuvant sur des organismes marins, représentatifs de quatre niveaux trophiques, à savoir des micro-algues, un échinoderme, des bivalves et un poisson. L'analyse de la pollu-sensibilité est basée sur l'utilisation de différents bio-essais existants ou adaptés au contexte de cette étude.

Les tests de toxicité ont permis d'évaluer la sensibilité de trois espèces phytoplanctoniques (*Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis aff. Galbana* et *Tetraselmis suecica*) vis-à-vis d'un fongicide l'époxiconazole (pur et en formulation commerciale Opus) et de l'adjuvant nonylphénol. D'une manière générale, la croissance de *C. calcitrans* et *I. aff. Galbana* s'avère plus sensible à l'action des contaminants étudiés. Ainsi, en utilisant pour *C. calcitrans* un milieu reproduisant les conditions naturelles du Golfe de Gabès, des valeurs de CE_{50} de 2 ,31 mg/L et 2,9 µg/l sont obtenues respectivement avec la substance active époxiconazole, et le produit formulé. Ces résultats montrent l'importance des adjuvants dans la toxicité et que les micro-algues peuvent être sensibles aux effets non-cibles d'un fongicide triazole.

En outre, l'âge des cellules, les conditions d'éclairement et de composition des milieux de culture induisent des changements de sensibilité au fongicide, suggérant que la densité cellulaire est un paramètre important dans les tests de toxicité.

L'analyse de quelques paramètres physiologiques montre que les contaminants utilisés induisent une augmentation du volume cellulaire, des échanges gazeux, de la teneur en pigments et en ATP. Il apparaît ainsi que les toxiques utilisés réduisent la vitesse de croissance, prolongeant le cycle cellulaire, sans affecter la production de nouveaux matériaux, nécessaires à la construction de nouvelles cellules.

Par ailleurs, une étude réalisée en microcosmes lors d'un bloom de l'algue toxique *Karenia selliformis* dans le golfe de Gabès, montre que les différents contaminants chimiques (époxiconazole, chlorpyriphos-éthyl, nonylphénol) produisent des modifications drastiques de la structure des communautés phytoplanctoniques, fonction de la nature et de la concentration du contaminant.

La toxicité des différents contaminants a été étudiée sur des animaux marins, aux stades embryo-larvaire (oursin, huître, palourde), métamorphose des larves (palourde) et survie des larves (turbot). Les résultats montrent que les larves du turbot sont les plus sensibles à l'action des contaminants avec des CE_{50} allant de 2,78 à 492 µg/L selon le toxique et que chez la palourde, la métamorphose est le stade le plus sensible parmi les trois stades de développement étudiés. Les contaminants utilisés produisent des anomalies du développement et des malformations embryonnaires qui peuvent induire une réduction de la production naturelle en agissant i) directement sur le développement embryo-larvaire et ii) indirectement sur la qualité et la biodisponibilité de l'aliment à travers la variation de la biomasse phytoplanctonique. Ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer les toxiques à différents organismes marins présentant des organisations différentes pour apprécier pleinement leur impact.

Mots-clés : pesticides, phytoplancton, échinoderme, bivalves, poisson, paramètres physiologiques, communautés naturelles, niveaux trophiques supérieures, stades de développement, bio-essais, microcosmes, golfe de Gabès.